



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

**I BIOMARCATORI CARDIACI IN CORSO DI
ENDOCARDIOSI MITRALICA**

Candidata:

Girasole Roberta

Relatore:

Prof. Marco Bizzeti

Correlatore:

Dott.ssa Lucia Carlucci

Anno accademico 2013/2014

INDICE

RIASSUNTO/ABSTRACT	PAG. 3
INTRODUZIONE	PAG.4
<u>PARTE GENERALE</u>	
CAPITOLO I: I BIOMARCATORI CARDIACI	PAG. 6
1.1 INTRODUZIONE	PAG. 6
1.2 TROPONINA CARDIACA	PAG. 20
1.3 PEPTIDI NATRIURETICI	PAG. 28
1.4 SEROTONINA	PAG. 45
CAPITOLO II: ENDOCARDIOSI MITRALICA	PAG. 54
2.1 EZIOLOGIA	PAG. 56
2.2 ANATOMIA E ISTOLOGIA DELLA VALVOLA MITRALE	PAG. 58
2.3 FUNZIONE DELLA VALVOLA MITRALE	PAG. 62
2.4 FISIOPATOLOGIA	PAG. 64
2.5 SINTOMATOLOGIA ED ESAME CLINICO	PAG. 68
2.6 STRUMENTI DIAGNOSTICI	PAG. 70
2.7 TRATTAMENTO	PAG. 72
CAPITOLO III: BIOMARCATORI CARDIACI NELL'ENDOCARDIOSI MITRALICA	PAG. 74
3.1 TROPONINA	PAG. 74
3.2 TROPONINA E BNP	PAG. 80
3.3 PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B	PAG. 86
3.4 SEROTONINA NELLA MMVD	PAG. 94
<u>PARTE SPERIMENTALE</u>	
CAPITOLO IV: MATERIALE E METODI	PAG. 100
CAPITOLO V: RISULTATI	PAG. 113
CAPITOLO VI: DISCUSSIONE	PAG. 124
CAPITOLO VII: CONCLUSIONE	PAG. 133
BIBLIOGRAFIA	PAG. 134

RIASSUNTO

Parole Chiave: Troponina cardiaca I (cTnI), Peptide Natriuretico di tipo B (BNP), Serotonina (5HT), Endocardiosi Mitralica (MMVD), Cane.

Introduzione: L'endocardiosi è la cardiopatia più diffusa nel cane; per diagnosticarla, a supporto della visita clinica, si utilizzano esami diagnostici quali: elettrocardiografia, radiografia ed ecocardiografia, che sono relativamente costosi, richiedono tempo, necessitano di apparecchiature ed esperienza dell'operatore per essere correttamente interpretate. I biomarcatori cardiaci e neuroormonali di nuova generazione potrebbero, anche in urgenza, offrire al medico veterinario informazioni utili per identificare la presenza di una patologia dell'apparato cardiovascolare.

Obiettivi: Determinare le concentrazioni di cTnI, BNP e serotonina in soggetti affetti da endocardiosi mitralica; valutare le concentrazioni sieriche di cTnI in cani con MMVD con due diversi analizzatori e comparare le due metodiche di laboratorio. IMMULITE 2000® è un metodo a chemiluminescenza, TOSOH è un metodo immunoenzimatico e di BNP con IDEXX e TOSOH; per finire determinare se i tre biomarcatori cardiaci sono correlati tra loro e con il peggioramento dell'endocardiosi mitralica.

Animali, materiali e metodi: Allo studio clinico hanno preso parte 91 cani affetti da MMVD. In base ai rilievi clinici e strumentali, il grado d'insufficienza cardiaca dei pazienti è stato classificato secondo Consensus Statements of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM). Nella successiva fase tutti i cani sono stati testati per la troponina cardiaca I, 8 dei 91 per il BNP e infine 20 dei 91 anche per la serotonina.

Risultati: E' stata evidenziata una correlazione tra i due analizzatori della troponina: IMMULITE 2000 e TOSOH, mentre non si rileva nessuna corrispondenza tra le misurazioni di BNP ottenute con IDEXX e TOSOH. Nonostante i valori non altamente significativi per la serotonina e il BNP, le concentrazioni di ogni biomarcatore aumentano all'aggravarsi della patologia degenerativa mitralica.

Conclusioni: I nostri risultati sono concordi con i dati bibliografici. Dovranno essere condotti ulteriori studi su una popolazione più ampia e omogenea per un'ulteriore validazione prima di entrare a far parte del pannello di esami ematici, normalmente effettuati nella clinica. La rapidità e la facilità di esecuzione, il costo contenuto e la non invasività di tali test, li rendono degli ottimi candidati per l'uso nella pratica veterinaria.

ABSTRACT

Key Words: Cardiac troponin-I (cTnI), Brain natriuretic peptide (BNP), Serotonin (5HT), Mixomatous mitral valve disease (MMVD), Dog.

Introduction: Myxomatous degenerative mitral valve disease (MMVD) is a common heart disease in the dog. In order to diagnose this disease, in support of the clinic visit, a number of diagnostic tests are employed (electrocardiography, radiography and echocardiography). All these tests are relatively expensive, time consuming, require equipment and experience of the operator to be properly assessed. The new generation cardiac and neuro-hormonal biomarkers might provide useful information identifying the presence of cardiovascular system diseases.

Objectives: To determine cTnI, BNP and serotonin concentrations in subjects affected by mitral valve disease; to evaluate the serum concentrations of cTnI in dogs affected by MMVD through the use of 2 different analyzers and compare the 2 analytical methods. The IMMULITE 2000 and TOSOH devices worked by chemiluminescence and immunoassays method, respectively and BNP with IDEXX and TOSOH method. To assess if the three cardiac biomarkers are related to each other and with the worsening of the MMVD.

Animals, Materials and Methods: 91 dogs affected by MMVD were included in the study. Dogs were classified according to clinical and instrumental exams. The patients' heart failure was classified according the Consensus Statements of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM). All the dogs were assayed for the cardiac troponin I, 8 out of 91 for BNP and 20 out of 91 for serotonin concentrations.

Results: IMMULITE 2000 and TOSOH method showed similar results in troponin I quantification. On the other hand no correspondence between values of BNP using the 2 methods (IDEXX vs. TOSOH) was assessed. Although serotonin and BNP values were quite different from those reported in the literature, a positive correlation between the biomarkers increase and worsening of the MMVD was assessed.

Conclusions: The present results concerning the IMMULITE 2000 and TOSOH comparison are in line with those reported in the literature. A larger and more homogeneous sample size of animals is requested prior using these tests for clinical evaluations. The low time consuming, simplicity of execution, the low cost and not the invasiveness of these tests, make them excellent candidates for the use in clinical practice.

INTRODUZIONE

Il termine di "marker biochimici di insufficienza cardiaca" viene comunemente impiegato per definire alcuni peptidi (BNP, troponina, serotonina ecc.), i cui livelli plasmatici appaiono correlati con lo stadio clinico e la condizione emodinamica, nonché con la prognosi dei pazienti affetti da patologie cardiache. Il biomarker cardiaco ideale potrebbe essere definito come una sostanza, il cui dosaggio consente di diagnosticare la patologia cardiaca, svelare eventuali forme occulte, discriminare la dispnea cardiaca da quella su base respiratoria ed infine, fornire indicazioni prognostiche e terapeutiche. In medicina umana il dosaggio dei peptidi natriuretici viene ormai eseguito di routine in campo cardiologico, rappresentando un valido ausilio nel monitoraggio dei pazienti cardiopatici. Nonostante l'ampia descrizione di tutti i biomarcatori che intervengono nei vari processi patologici del cuore, di fatto, sono due quelli veramente utilizzati nella pratica clinica veterinaria: BNP e troponina.

Alla diffusione dell'utilizzo di tali biomarker ha contribuito senza dubbio la loro non invasività e la semplicità della determinazione analitica. Nel cane, nonostante la presenza in commercio di kit diagnostici appositamente validati per questa specie, il loro inquadramento nell'ambito di un iter diagnostico per la gestione clinica del paziente cardiopatico, appare ancora poco definito, necessitando di ulteriori verifiche cliniche.

I biomarker cardiaci, non possono rappresentare l'unico elemento su cui basare la gestione dei pazienti cardiopatici e il loro significato deve essere sempre interpretato nell'ambito di una valutazione clinico-diagnostica completa ed articolata.

I vantaggi dell'impiego di test con i biomarker sono la velocità di acquisizione dei risultati e un ottimo costo-beneficio, anche se, ad oggi, l'esame "gold standard" per diagnosticare e monitorare l'evoluzione delle cardiopatie in ambito veterinario è l'ecocardiografia.

In questo lavoro si vuole cercare di dare un *input* alla strategia multi-marker, che potrebbe rappresentare, in futuro, un valido aiuto per il

cardiologo, per stratificare il rischio nei pazienti veterinari, determinare la gravità della patologia e la prognosi del paziente. Alla cTnI e al BNP, nel nostro lavoro, è stata aggiunta la serotonina, biomarker cardiaco di più recente introduzione che si ritiene abbia un ruolo importantissimo nella patogenesi della malattia degenerativa mitralica.

Nel primo capitolo abbiamo fatto una sintesi delle informazioni presenti in bibliografia sui biomarcatori, soffermandoci sulla storia di quelli cardiaci, dalle prime scoperte ad oggi e facendo poi riferimento, nel particolare, alla troponina, al peptide natriuretico di tipo B e alla serotonina.

Nel secondo capitolo è stata analizzata la patologia degenerativa della valvola mitralica o endocardiosi.

Nel terzo capitolo vengono presi in considerazione gli studi scientifici su questi tre biomarcatori nei soggetti affetti da endocardiosi mitralica e le scoperte o le ipotesi finora raggiunte.

La parte sperimentale è composta da: materiale e metodi, dove sono state inserite le descrizioni delle metodiche analitiche usate, la popolazione in studio e le sue caratteristiche, i risultati ottenuti ed infine, le conclusioni che abbiamo ritenuto di trarre, sulla scorta dei dati bibliografici.

PARTE GENERALE

CAPITOLO I: I BIOMARCATORI CARDIACI

1.1 INTRODUZIONE

Partiamo dal principio. Cos'è un biomarcatore?

Un biomarcatore è una sostanza che è:

- Specifica di un organo o un tessuto in fase di studio;
- Rilasciato in proporzione ad una lesione o una malattia.

Per essere clinicamente attendibile, un biomarcatore dovrebbe fornire informazioni riguardanti la diagnosi, la prognosi o l'eventuale risposta ad un trattamento che altrimenti non sarebbe facilmente disponibile, utilizzando prove convenzionali.

L'uso di marcatori sierici non cardiaci, è un esempio esplicativo dell'importanza che hanno avuto questi biomarcatori nella pratica clinica; prendiamo per esempio la gamma-glutamyl-transferasi come indice di colestasi o il dosaggio della creatinina per individuare patologie renali¹.

Una definizione più appropriata di biomarker ci arriva dall'US National Institutes of Health, che ci dà una definizione ufficiale di biomarcatore: "è una caratteristica che è oggettivamente misurata e valutata come un indicatore di processi biologici normali, processi patogenici o risposte farmacologiche ad un intervento terapeutico"².

Specificità tissutale dei markers di lesione

Un marker per essere specifico deve provenire da un determinato tessuto, e solo da quello, in questo caso il suo valore diagnostico sarà elevato.

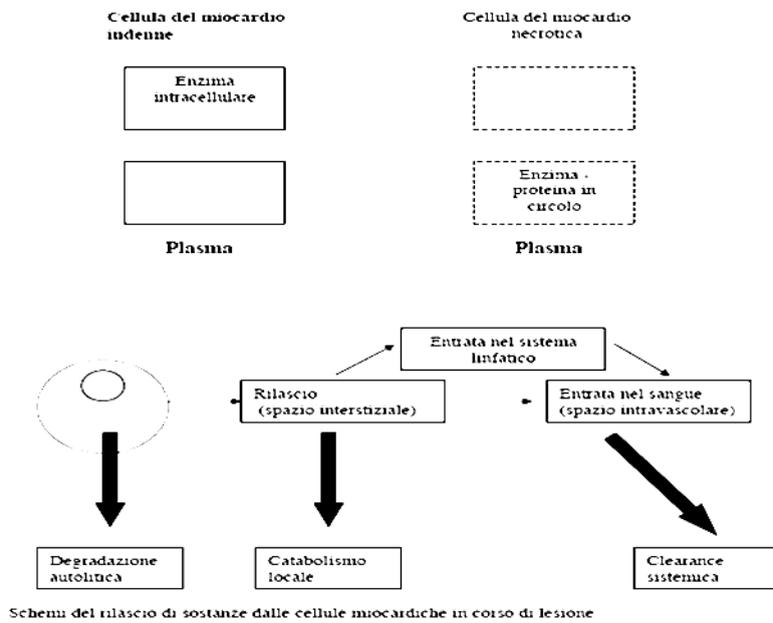
Questo requisito è caratteristico di poche sostanze, ma l'origine multitissutale può essere superata mediante l'associazione di più marker, o attraverso l'utilizzo di isoenzimi (proteine che catalizzano la stessa reazione, ma differiscono per particolarità strutturali).

Come markers di lesione si utilizzano:

- Sostanze normalmente non presenti nelle cellule (e quindi nemmeno in circolo);
- Sostanze normalmente presenti, ma che possiedano variazioni quantitative.

I fattori che regolano la fuoriuscita dei marcatori dalla cellula e la loro permanenza nei liquidi organici sono i seguenti:

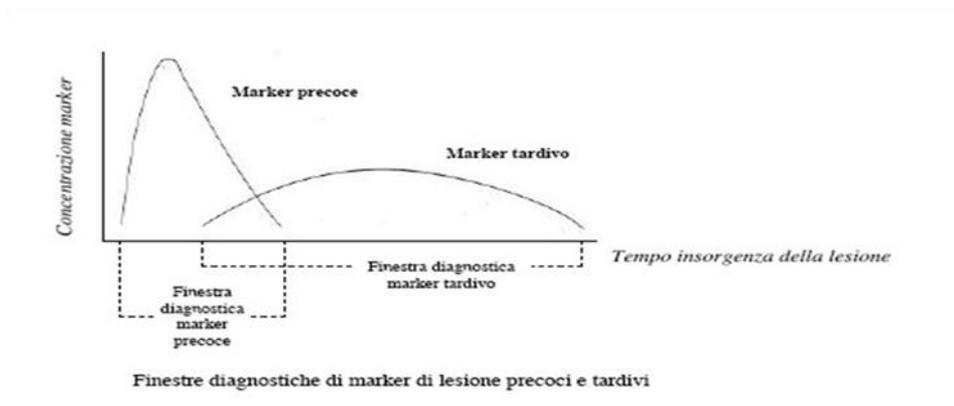
- Gradiente di concentrazione;
- Peso molecolare;
- Localizzazione intracellulare;
- Tempo di attraversamento del plasma;
- Catabolismo;
- Vie di eliminazione.



I markers che entrano rapidamente nei liquidi biologici, tendono ad avere una "finestra diagnostica" che inizia precocemente, rispetto all'esordio della lesione; al contrario, si comportano quelli che entrano tardivamente e lentamente in circolo.

Le applicazioni cliniche sono molto importanti:

- La precocità della diagnosi è legata all'utilizzo dei markers precoci;
- Il follow-up di una patologia è legata all'utilizzo dei markers tardivi.



La finestra diagnostica può essere definita come: "l'intervallo di tempo durante il quale la misurazione della concentrazione di un marker nei liquidi biologici consente di dimostrare la presenza di una lesione d'organo o sistema".

La concentrazione del marker, deve essere al di sopra di un valore critico scelto (livello critico) per dare significato diagnostico valido al marker in questione.

Vi sono in medicina umana e veterinaria molti biomarcatori per rilevare determinate patologie, ma in certe aree gli studi non sono andati avanti per la mancanza di consenso ad utilizzare questi marcatori per studi preclinici e clinici.

Spesso il test gold standard, in studi preclinici, è l'istopatologia e questo, di solito, richiede delle procedure burocratiche molto complesse da parte delle autorità di regolamentazione per un'adeguata dimostrazione di sicurezza in modo tale che questi studi, iniziati su modelli animali possano essere portati avanti in studi sull'uomo.

Inoltre l'istopatologia di solito non può essere facilmente applicato negli studi sull'uomo.

Il problema con l'istopatologia, come unico approccio alla valutazione del danno tissutale, è che risulta essere molto costoso, soprattutto quando si parla di procedure da attuare in medicina veterinaria e richiede tempi molto lunghi.

Biomarcatori nelle malattie cardiovascolari

Cercando di avere un quadro generale della situazione, possiamo tentare di individuare l'utilità e le potenziali applicazioni cliniche di un biomarcatore in generale.

Dovrebbe:

- 1) Individuare patologie sub-cliniche;
- 2) Diagnosticare patologie acute o croniche;
- 3) Suddividere i pazienti in base al rischio;
- 4) Monitorare la progressione della malattia o la risposta alla terapia;
- 5) Selezione della terapia.

Generalmente i biomarcatori che vengono presi in considerazione riescono a soddisfare almeno uno dei cinque punti, ma per arrivare soprattutto agli

ultimi tre sono necessari degli studi longitudinali e questi quindi risultano più difficili da dimostrare.³

Un biomarker cardiaco ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

Alta sensibilità

- Alta concentrazione nel miocardio dopo danno miocardico;
- Rilascio rapido per la diagnosi precoce;
- Lunga emivita nel sangue per la diagnosi tardiva.

Alta specificità

- Assente in tessuti non miocardici;
- Non rilevabile nel sangue di soggetti non malati.

Caratteristiche analitiche

- Misurabile con test di costo-efficacia;
- Semplice da eseguire;
- Tempi di consegna rapida;
- Precisione sufficiente e veridicità.

Caratteristiche cliniche

- Capacità di influenzare la terapia;
- Capacità di migliorare l'*outcome* del paziente.

In un recente articolo Braunwald propose un sistema per classificare i biomarkers usati nelle insufficienze cardiache⁴; quest'ultimo venne leggermente modificato, portando alla creazione della seguente lista:

- Marker di danno miocitico;
- Marker di stress miocitico;
- Marker di rimodellamento;
- Marker di disfunzione endoteliale;
- Marker di infiammazione;
- Marker neurormonali;

Tra i primi ritroviamo la troponina I e T e gli isoenzimi della creatininchinasi, tra i markers di stress ritroviamo il peptide natriuretico di tipo B. Naturalmente la lista per ogni gruppo è molto più estesa ma dobbiamo

ricordare che, solo la troponina e il peptide natriuretico di tipo B, sono maggiormente utilizzati nella pratica clinica.

Biomarkers cardiaci

La maggior parte dei metodi utilizzati nella pratica clinica per la valutazione di danno cardiaco, quali l'ecocardiografia e l'angiografia con radio nucleotidi (Medicina Umana), ha mostrato una bassa accuratezza diagnostica ed uno scarso potere predittivo⁵.

Tali mezzi diagnostici sono in grado di identificare il danno cardiaco solo quando esso ha già avuto ripercussioni anatomo-funzionali, a volte anche gravi, vanificando, in questo modo, ogni possibile strategia di prevenzione di una cardiomiopatia.

Per questo motivo, vi è una crescente aspettativa verso nuovi strumenti diagnostici non invasivi, sensibili, poco costosi e facilmente ripetibili che consentano di stratificare precocemente i pazienti in rapporto al loro rischio per quella patologia cardiaca⁶.

La valutazione della funzione cardiaca nei piccoli animali può risultare molto impegnativa.

Spesso la storia del paziente è talvolta aspecifica, la presenza o l'intensità di un soffio cardiaco e gli esami fisici non sono sempre correlati alla gravità della malattia, la compresenza di una malattia polmonare può confondere l'interpretazione delle radiografie toraciche; le altre indagini sono solitamente effettuate mediante elettrocardiografia, radiografia ed ecocardiografia.

Questi ultimi test sono relativamente costosi, richiedono tempo e, nel caso dell'ecocardiografia, necessitano non solo di apparecchiature appropriate ma anche di operatori esperti, associazione non sempre disponibile in tutte le strutture¹.

Sino a non molto tempo fa, per il cuore mancavano analoghi test ematochimici.

Nell'uomo, per contribuire alla diagnosi dell'infarto miocardico acuto, sono stati impiegati parecchi enzimi cardiaci, ed in particolare, la creatin-chinasi, la mioglobina e la latticodeidrogenasi.

Sfortunatamente, queste sostanze sono generalmente prive di sensibilità e specificità sufficienti a consentirne con successo l'applicazione clinica nel cane.

Nell'ultimo decennio, è stata sviluppata una nuova generazione di marcatori cardiaci e neurormonali.

Tali marcatori hanno trovato impiego in medicina umana, non solo per l'infarto miocardico, ma anche nell'ambito dell'insufficienza cardiaca cronica.

I dati emergenti indicano che è possibile utilizzare per la valutazione clinica dei cani con cardiopatia fino a tre differenti marcatori cardiaci biochimici.

Tali marcatori, il peptide natriuretico atriale (ANP), il peptide natriuretico di tipo B (BNP) e la troponina cardiaca I (cTnI), possono offrire ai clinici utili informazioni circa la presenza dell'insufficienza cardiaca congestizia, l'identificazione di malattie asintomatiche (occulte) e la gravità del danno sottostante subito dal tessuto miocardico.

Oyama ed altri cardiologi sono ottimisti nel ritenere che questi test finiranno per diventare disponibili su vasta scala, essere utilizzati di routine e risultare dei mezzi clinicamente utili per la valutazione della cardiopatia nel cane.

Prospettiva storica di biomarkers di danno d'organo

I biomarcatori, quali indici di danno cardiaco, si sono sviluppati solo in tempi abbastanza recenti.

I biomarcatori sono presenti all'interno delle cellule cardiache, note come "miociti".

Quest'ultimi rappresentano la cellula principale nel cuore.

I miociti essenzialmente si comportano come le cellule nervose, quindi non sono in grado di rigenerarsi, se muoiono, la funzione cardiaca ha un'alta probabilità di essere compromessa.

Quando la cellula muore, le proteine al suo interno vengono rilasciate, le proteine nel citoplasma lasciano più rapidamente la cellula di quelle presenti nelle membrane cellulari o degli elementi fissi.

Da ciò si rileva che, i marcatori più sensibili sono quelli presenti maggiormente all'interno della cellula, e siccome la funzione principale del cuore è la contrazione, le proteine che svolgono questa funzione risultano delle ottime candidate come biomarkers di danno cardiaco; in più queste proteine sono facilmente ritrovabili nel sangue.

Una volta usciti dalla cellula cardiaca, queste proteine raggiungeranno il circolo ematico.

Poiché un'occlusione del flusso di sangue è la causa primaria di infarto miocardico, la maggior parte delle proteine raggiungono il sangue attraverso i vasi linfatici dove possono essere soggetti a degradazione, con conseguente comparsa ritardata nel sangue⁷.

Storia dei biomarcatori cardiaci

Fino a 20 anni fa, il laboratorio clinico aveva messo a disposizione del cardiologo solo alcuni test per la rilevazione retrospettiva di necrosi del tessuto cardiaco, come ad esempio i metodi enzimatici per la creatin-chinasi e le attività della lattato deidrogenasi.

Tuttavia, nella seconda parte del XX secolo, test altamente sensibili e specifici, come quelli sulla troponina cardiaca, come marcatori di funzione miocardica, così come i peptidi natriuretici cardiaci, hanno rapidamente cambiato lo scenario della gestione clinica dei pazienti con malattie cardiache, assegnando al laboratorio un ruolo fondamentale nell'ambito della diagnostica generale.

Ciò è testimoniato dal recente inserimento di questi marcatori in linee guida internazionali e nella ridefinizione di infarto del miocardio.⁸

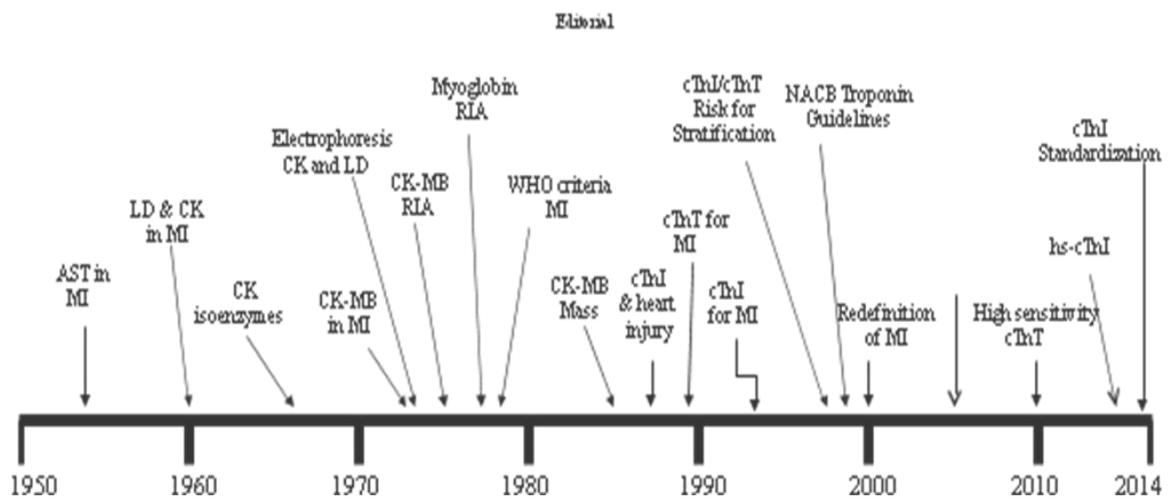


Figura 1 ⁹

Il primo test enzimatico, utilizzato per diagnosticare soggetti con IMA (infarto miocardico acuto), fu l'ossalacetico transaminasi glutammico, ora chiamato aspartato aminotransferasi (AST), scoperto nel 1954 da Karmen e collaboratori¹⁰.

L'utilizzo di questa pratica richiedeva, però, lo sviluppo di spettrofotometri ad alte temperature e fonti di reagenti puri, in più si scoprì che questo enzima non era completamente cardiospecifico, essendo ubiquitariamente presente anche nel fegato, nel muscolo scheletrico, nei globuli rossi, ed in molti altri tessuti; quindi ne venne abbandonato l'uso.

Tuttavia, questa scoperta spinse a portare avanti altre ricerche relative alla determinazione di necrosi miocardica, tramite test enzimatici.

Nel 1955 venne in auge un nuovo enzima chiamato lattico-deidrogenasi (LD) e i suoi 5 isoenzimi (LD1-LD5), di questi, si scoprì che la LD1 aveva un'affinità maggiore per il muscolo miocardico rispetto agli altri quattro isoenzimi.

A causa della difficile procedura per la separazione dei suddetti isoenzimi, della sua risposta tardiva e scarsa specificità, anche questo biomarker ebbe vita breve; finché nel 1959/1960 la creatin-chinasi (CK) si dimostrò essere un possibile marker per la diagnosi del danno muscolare cardiaco.

Misurazioni della CK vennero fatte da molti studiosi, in particolare da Gabor Szasz, che condusse un approfondito studio delle variabili che influenzano la misurazione del CK.

Per superare la scarsa specificità nella diagnosi di necrosi miocardica di questi enzimi, presenti in diversi tessuti ed organi, si cominciò ad esaminare le misure delle loro frazioni isoenzimatiche.

Infatti, la creatina chinasi è costituita da tre frazioni: CK-MM, CK-MB, CK-BB che, con lo sviluppo dei metodi elettroforetici, acquisirono una maggiore specificità rispetto al CK totale.

Nel 1970, attraverso numerosi studi, si arrivò alla scoperta di anticorpi monoclonali¹¹, con lo sviluppo di anticorpi monoclonali con CK-MB isoenzimi, che rivoluzionarono le diagnosi di patologie nell'uomo, incluso l'infarto miocardico .

Per quanto riguarda il dosaggio di questo isoenzima, nel 1975 è stata sviluppata una tecnica facilmente automatizzabile: l'immuno-inibizione.

Si sfrutta un anticorpo policlonale anti monomero M e si determina, successivamente, l'attività residua della CK attribuibile al monomero B non inibito.

Lo sviluppo di metodi immunometrici permise di quantificare la massa proteica degli enzimi cardiaci, aprendo la strada anche a determinazioni di proteine cardiache non enzimatiche.

La prima proteina indagata fu la mioglobina (Myo) nel 1975, ma con metodo RIA inadatto alle necessità cliniche.

Solo vent'anni dopo, un metodo non isotopico ne consentì la diffusione come marcatore appropriato della fase precoce dell'IMA.

Nel 1979 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definì come criteri, per la diagnosi di infarto miocardico acuto (IMA) in umana, la triade:

- storia di dolore toracico, tipico se acuto, grave (resistente alla nitroglicerina), prolungato (> 20 min);
- alterazioni elettrocardiografiche (ECG), non equivoche, con presenza di persistenti onde Q in almeno due derivazioni contigue dell'ECG standard;
- incremento degli enzimi cardiaci seriatim, non equivoche, se con iniziale aumento e successiva caduta, in tempi caratteristici, per ciascun tipo di enzima, tempo trascorso dall'inizio dei sintomi e cadenza dei prelievi di sangue.

Alla metà degli anni '80 fu messo a punto il metodo immunometrico per la determinazione della massa proteica della CK-MB (CK-MBm) che, ancora oggi, è considerata il "gold standard" come marcatore biochimico di danno, rilevabile per molte ore e, quindi, fornendo una diagnosi anche tardiva, dosabile rapidamente e facilmente.

Nel 1987 si svilupparono dei test per misurare le proteine strutturali cardiache.

I primi studi si focalizzarono sulle catene leggere della miosina.

Tuttavia, le catene leggere della miosina risultarono molto velocemente non specifiche per il miocardio.

Così tali prove si focalizzarono sulla troponina cardiaca, in particolare prima sulla troponina cardiaca I (cTnI) e poi nel 1989 sulla troponina cardiaca T (cTnT)¹².

La valutazione quantitativa di cTnT e di cTnI determinò un cambiamento importantissimo nel campo della misurazione con i biomarkers cardiaci nella diagnosi di infarto miocardico in pazienti che si presentano in pronto soccorso con un dolore toracico.

I primi studi clinici, confrontando vari biomarkers, trovarono che, circa un terzo dei pazienti considerati esclusi dalla probabilità di avere un infarto miocardico acuto, sulla base di una CK-MB bassa, invece avevano un elevato valore di cTnT o di cTnI.

Inoltre, alti livelli di troponina erano stati correlati ad un rischio significativo di altri eventi avversi, sempre di origine cardiaca, (MI successiva, morte cardiaca o in cardiopatie ischemiche non infartuale come per l'angina instabile).

La capacità predittiva di concentrazioni elevate di cTnT e di cTnI è stata successivamente confermata in un gran numero di studi e meta-analisi.

La superiorità di cTnT e di cTnI portò ad una rivalutazione del ruolo dei biomarcatori cardiaci in pazienti che si presentavano con sospetta malattia coronarica.

Nel 1998 l'Accademia Nazionale di Biochimica Clinica (NACB) delineò consigli e linee guida, e confermò il valore ormai ampiamente riconosciuto della cTnT e della cTnI.

Nonostante ciò, il passaggio dall'uso della CK-MB alla troponina fu molto lento per una serie di motivi clinici e gestionali.

Solo nel 2000 apparve, a cura di K. Thygesen e JS. Alpert, il Documento Consensuale del Comitato Congiunto ESC/AAC per la ridefinizione dell'Infarto del Miocardio (IMA).

Non si trattò di una Linea Guida formale ma fu fondamentale per le rivoluzionarie affermazioni epidemiologiche, cliniche, diagnostiche in tema di danno miocardio ischemico.

Alla fine degli anni '90 i marcatori cardiaci in discussione furono sostanzialmente la mioglobina, le isoforme di CK-MB, CK-MB come attività o come massa, le cTnT e le cTnI, le cui caratteristiche fisiopatologiche e molecolari, la compartimentazione cellulare e il meccanismo di rilascio, il tempo di comparsa nel sangue e l'incremento relativo dopo lesioni reversibili/irreversibili erano ben conosciuti.

Nacque il concetto di danno miocardio minimo (minor myocardial damage), per descrivere i pazienti non IMA e con CK-MB normali ma con Tn patologiche e quindi con aumentato rischio e la necessità di 2 livelli decisionali per i nuovi marcatori cardiaci, molto più sensibili di quelli enzimatici, rispettivamente per il danno minimo e per IMA.

Emerse il concetto di Sindrome Coronarica Acuta (SCA) come termine che comprendeva tutti i quadri clinici con ischemia acuta miocardica, da AI a ogni forma di IMA (con elevazione o depressione di ST, con o senza onda Q), in quanto tutti legati all'instabilità della placca alla quale si riferiva il rischio.

Da un punto di vista fisiopatologico apparve fondamentale la discussione intorno alla differenza tra lesione reversibile con rilascio del pool citosolico dei marcatori e la necrosi cellulare irreversibile con rilascio delle proteine strutturali.

Nella ragionevole convinzione che, a lungo, le troponine avrebbero avuto un ruolo importantissimo nella diagnosi della SCA, i produttori iniziarono a sviluppare nuovi metodi immunochimici, caratterizzati da una sensibilità analitica ancora superiore, al fine di poter identificare più sensibilmente e precocemente la presenza di un danno miocardico.

In particolare, i metodi definiti "ultrasensibili" (highly-sensitive) consentirono d'identificare concentrazioni di troponina inferiori a 0,002 µg/L rispetto al consueto intervallo compreso tra 0,02 e 0,06 µg/L.

Il primo aspetto essenziale nell'uso routinario dei metodi ultrasensibili fu l'identificazione di un cut-off appropriato ed attendibile, che consentisse di distinguere inequivocabilmente la popolazione sana da quella malata.

Malgrado non fosse cambiato l'approccio alla definizione della soglia diagnostica (i.e., definizione di un intervallo al 95% della popolazione sana con CV del metodo inferiore al 10%), fu evidente che si aprirono maggiori problemi nell'accurata selezione della popolazione sana, in considerazione delle variabili biologiche che avrebbero potuto influenzare la concentrazione plasmatica delle troponine (e.g., "rimodellamento" cardiaco fisiologico o patologico, esercizio fisico, lieve alterazione della funzione renale).

Un secondo aspetto determinante fu la distinzione degli incrementi patologici, conseguenti a danno miocardico irreversibile, da quelli invece riconducibili ad una sofferenza minore e transitoria del miocardio e, quindi, priva di significato clinico.

Quest'ultimo aspetto, in particolare, era virtualmente assente utilizzando i metodi tradizionali, perché i modestissimi incrementi plasmatici rimanevano comunque al di sotto della soglia analitica di rilevazione.

Al contrario, con i nuovi metodi ultrasensibili, anche modestissimi incrementi plasmatici sono rilevabili e non distinguibili (almeno senza la clinica) da situazioni in cui il marcatore è rilasciato nelle fasi iniziali di un IMA.

La "storia molecolare" dei peptidi natriuretici cardiaci cominciò, invece, nel 1981 grazie a De Bold et al., la cui prima osservazione fu quella che, estratti del miocardio atriale, quando iniettati nei ratti, provocavano una risposta natriuretica rapida e importante.

Venne così isolato dal tessuto atriale, un peptide con attività natriuretica nonché miorilassante, chiamato PN atriale (atrial natriuretic peptide, ANP), si proseguì nel 1988 con l'isolamento dal tessuto ventricolare del PN cerebrale (brain natriuretic peptide, BNP) e si arricchì, in seguito, dei

peptidi natriuretici di tipo C, D e V, nonché di un peptide renale denominato urodilatina.

Questi marcatori guadagnarono interesse clinico quando fu riferito che i pazienti con insufficienza cardiaca congestizia (CHF) avevano aumentate concentrazioni di CNP.

Il concetto di un marcatore di plasma per la valutazione clinica di CHF fu così introdotto e da allora è stato intensamente perseguito.

Fu incorporato, quindi, il CNP nel primo step per la valutazione dei soggetti sintomatici con sospetto di CHF.

Negli ultimi dieci anni, è stato dimostrato che i peptidi proBNP-derivati, cioè BNP e NT-proBNP, hanno una maggiore importanza clinica fisiologica e patologica.

Questo ha portato allo sviluppo di immunodosaggi, completamente automatizzate, che misurano peptidi che danno prestazioni sostanzialmente comparabili¹³.

1.2 TROPONINA CARDIACA

La troponina è una proteina essenziale nel processo di regolazione della contrazione del muscolo striato.

Questa dipende, a livello molecolare, dall'interazione fra la miosina, contenuta nel filamento spesso della fibra muscolare, e l'actina, contenuta nel filamento sottile.

L'interazione, mediata dal calcio, è regolata dal complesso troponina-tropomiosina situato lungo il filamento sottile.

Il complesso "troponina" è costituito da tre proteine: troponina C (TnC; C=calcio), troponina I (TnI; I=inibizione) e troponina T (TnT; T=tropomiosina).

La TnC, la TnI e la parte C-terminale della TnT formano una testa globulare, mentre la parte restante della TnT assume la forma di una bacchetta che interagisce con la tropomiosina, a sua volta legata all'actina.

Il calcio, liberato nel reticolo sarcoplasmatico come input alla contrazione, si lega ai siti modulatori della TnC inducendo una modificazione conformazionale dell'intera unità troponinica e conseguente esposizione sull'actina dei siti attivi specifici per il legame con la testa della miosina.

L'interazione dell'actina con la miosina promuove lo scorrimento delle fibre sottili su quelle spesse con accorciamento delle fibre muscolari e contrazione del muscolo.

Quando il calcio torna nel reticolo sarcoplasmatico, il complesso troponinico ritorna nella sua conformazione originale, la TnI inibisce l'attività ATP-asi dell'actomiosina e il muscolo si rilascia (Figure 1.2.1 e 1.2.2).

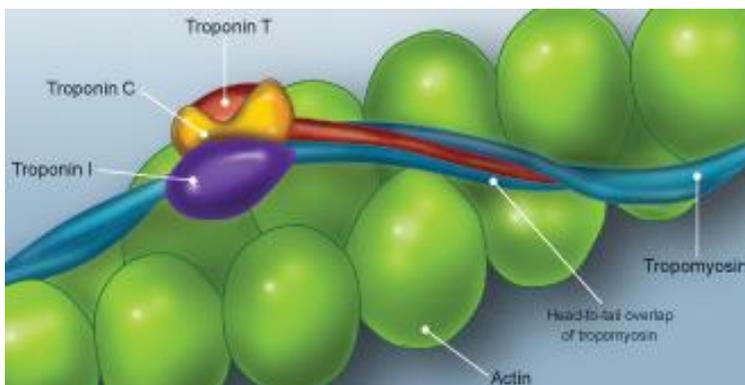


Fig 1.2.1

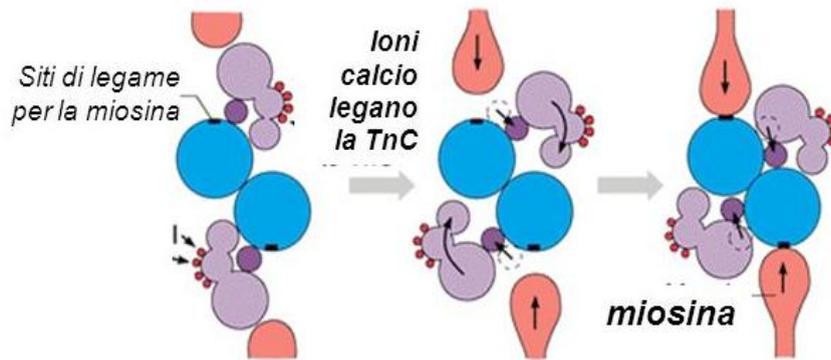


Figura 1.2.2: il legame del calcio alla troponina C, sposta il complesso troponina-tropomiosina dal sito di legame actino-miosinico.

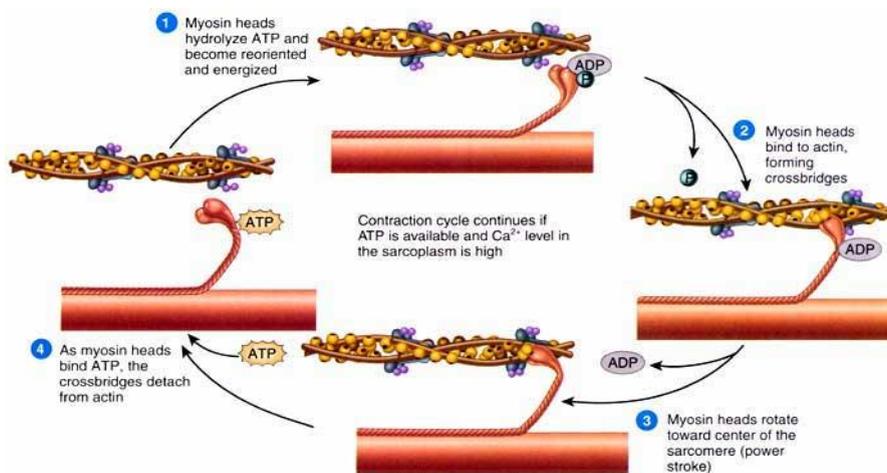


Figura 1.2.3: meccanismo della contrazione del muscolo cardiaco.

TnT e TnI hanno ognuna tre isoforme differenti, ognuna codificata da un gene diverso.

Queste isoforme si trovano nel muscolo cardiaco, nelle fibre muscolari scheletriche veloci e nelle fibre muscolari scheletriche lente e sono differenti per alcuni aminoacidi posizionati a livello della parte N-terminale della catena proteica che permette di identificarle come marcatori di lesione miocardica ad alta specificità.

La TnC è rappresentata da un'unica isoforma comune a tutti i tipi di muscolatura¹⁴.

La troponina in medicina umana

In medicina umana la troponina I cardiaca (cTnI) è il biomarcatore di elezione per la diagnosi di infarto miocardico acuto, con migliore sensibilità e specificità rispetto agli altri biomarcatori.

L'elevata sensibilità diagnostica delle troponine è strettamente connessa al fatto che il valore plasmatico nei soggetti normali è pressoché uguale a zero.

Pertanto, il loro dosaggio consente di identificare pazienti con piccolissimi, a volte microscopici, fenomeni di necrosi miocardica.

Inoltre, queste proteine sono rilasciate dal miocardio in proporzione all'entità del danno tissutale e della distruzione delle membrane dei miociti.

In caso di danno alle cellule cardiache, la perdita d'integrità della membrana determina la fuoriuscita della Tn e il conseguente rilascio nel circolo ematico.

Va notato che questo non si verifica in caso di apoptosi, perché durante il processo non si ha perdita dell'integrità della membrana e la Tn rimane all'interno della cellula¹⁵.

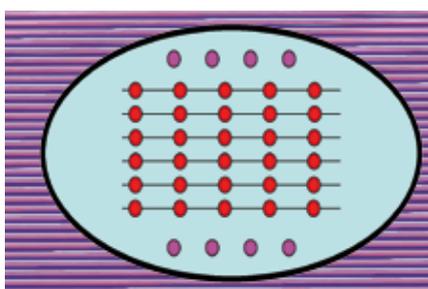


Fig 1.2.4

Nelle normali cellule del miocardio la troponina è presente nel citosol (cerchi viola) ed è legata ad intervalli regolari ai filamenti di actina delle proteine contrattili (cerchi rossi) (fig. 1.2.4).

Non è presente una notevole quantità di troponina nella regione extracellulare.

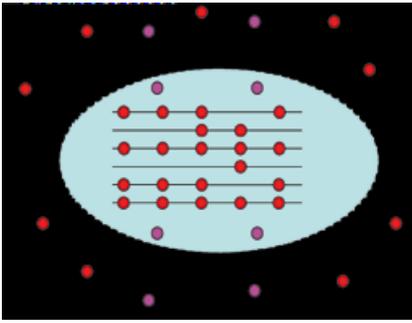


Fig 1.2.5

La perdita di integrità delle cellule del miocardio deriva dalla perdita di troponina nello spazio extracellulare, e quindi nel plasma, sia dal compartimento citosolico sia dal rilascio delle proteine miofibrillari (fig.1.2.5).

La cTnI subisce un innalzamento, rispetto ai valori normali, dalle 5 alle 7 ore successive all'inizio dell'infarto cardiaco e rimane, persistentemente elevata, per oltre 8 giorni¹⁶.

Sebbene l'infarto del miocardio sia un'evenienza piuttosto rara nella specie canina, la cTnI è stata associata a molte altre patologie cardiovascolari di frequente riscontro in questa specie.

In medicina umana, comunque, questo biomarcatore non è utilizzato soltanto nella diagnosi di infarto miocardico, in quanto elevati livelli di cTnI, associati a crescente degradazione delle miofibrille, sono stati riscontrati in pazienti con insufficienza cardiaca, in pazienti affetti da miocarditi e in pazienti oncologici trattati con alte dosi di chemioterapici¹⁷.

La troponina in medicina veterinaria

In medicina veterinaria è stato dimostrato che la cTnI è un biomarcatore specifico e sensibile di danno miocardico negli animali da laboratorio ed in varie altre specie animali tra cui: cani, gatti, bovini e cavalli.

Le tecniche utilizzate per il dosaggio della proteina sono diverse e non specie-specifiche, vengono infatti utilizzati metodi standardizzati per il dosaggio in medicina umana.

Sono numerosi gli studi effettuati volti a dimostrare la possibilità di utilizzare queste metodiche, anche in campo veterinario, che hanno ottenuto risultati positivi¹⁸.

A seconda del metodo utilizzato per il dosaggio sono riportati in letteratura i valori sierici in animali sani¹⁸⁻²¹, ai quali, in linea di massima, sono raffrontabili i valori riscontrati nei gruppi di controllo inseriti nei vari studi facenti parte della nostra bibliografia.

SPECIE	TnI ng/mL
UOMO SANO	0-0,026
CANE SANO	0-0,049
RATTO SANO	0-0,033

(P J O'Brien et al. 2006)

SPECIE	TnI ng/mL
CANE SANO	0,03-0,07
GATTO SANO	0,03-0,16

(Sleeper M. M. et al. 2001)

SPECIE	TnI ng/mL
CANE SANO	0,05-0,12
GATTO SANO	0-0,05

(Adin D.B. et al. 2005)

E' facile notare come i risultati siano variabili in base alla sensibilità dell'analizzatore utilizzato.

Numerosi studi, effettuati sul cane, riportano innalzamenti dei valori sierici di cTnI in una consistente varietà di patologie cardiache e sistemiche, oltre che in relazione all'età e nell'allenamento intensivo.

I risultati ottenuti indicano un effetto positivo dell'esercizio sul rilascio in circolo delle troponine.

I Greyhounds ritirati dalle corse, senza segni di patologie cardiache concomitanti, hanno valori basali di cTnI elevati rispetto a cani appartenenti ad altre razze esenti da cardiopatia.

Questi valori sono probabilmente collegati ad altri adattamenti fisiologici tipici di questa razza, quali una maggiore massa miocardica, una maggiore concentrazione di globuli rossi e di emoglobina che rendono questi cani avvantaggiati nella corsa rispetto a soggetti appartenenti ad altre razze.

I cani da slitta, sottoposti ad esercizio fisico intensivo, hanno mostrato valori di cTnI inferiori al limite di rilevamento dell'analizzatore utilizzato per il dosaggio prima dell'esercizio, ed un notevole innalzamento di tali valori, del tutto paragonabili a quelli riscontrati in animali soggetti a diverse patologie cardiovascolari, in conseguenza all'attività fisica.

Questi risultati sono da tenere in considerazione nell'approccio ad animali con sospetta cardiopatia che sono sottoposti a costante attività fisica la quale, come riportato, può alterare i valori di numerosi biomarcatori.

Nel gatto sono stati effettuati dosaggi della troponina I e T, in corso di cardiomiopatia ipertrofica, ed hanno dimostrato che gli animali affetti hanno valori sierici della proteina superiori rispetto a quelli sani.

Per i gatti con cardiomiopatia ipertrofica, associata a scompenso cardiaco in atto, sono riportati valori di cTnI superiori a quelli riscontrati nei pazienti affetti da ipertrofia, non associata a scompenso, e a quelli riscontrati in gatti con una storia di scompenso, associato alla cardiopatia.

Da questi dati scaturisce che vi è una correlazione tra valori alti e possibilità di morte ma non vi è correlazione tra il cambiamento di concentrazione della troponina T e l'ispessimento di parete del ventricolo sinistro²².

Studi effettuati su cani, con versamento pericardio, hanno riportato aumenti moderati nella concentrazione sierica di cTnI, in animali con versamento pericardio idiopatico, maggiori invece, in animali con versamento pericardico conseguente ad emangiosarcoma, anche se la dimensione della massa non è risultata correlata con il valore di troponina riscontrato^{23, 24}.

Questi risultati riflettono il fatto che la ridotta circolazione coronarica, in presenza di tamponamento cardiaco, porta ad ischemia che, non necessariamente, risulta in una necrosi del tessuto muscolare cardiaco.

Si suppone, quindi, che in caso di versamento pericardio idiopatico le troponine sieriche riscontrate siano maggiormente di origine citosolica²³.

Per quanto riguarda i tumori cardiaci maligni è assodato che causino necrosi del miocardio, quindi morte cellulare, e questo è di facile riscontro nell'osservazione degli alti valori di cTnI rilevati nei cani con versamento pericardio conseguente ad emangiosarcoma o ad altre neoplasie cardiache²³.

Innalzamenti dei valori di cTnI sono riportati anche in studi effettuati su Boxer affetti da cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro, patologia ereditaria tipica di questa razza, caratterizzata da variazioni della dimensione delle miofibrille, perdita di miofibrille, fibrosi ed infiltrazione adiposa²⁵.

E' stato descritto l'incremento delle concentrazioni di cTnI nei cani colpiti da una varietà di malattie cardiache quali: la miocardiopatia dilatativa (DCM), rigurgito della valvola mitrale, traumi toracici, torsione/dilatazione dello stomaco, miocardite e stenosi subaortica.

La cTnI non è uniformemente elevata nei cani con cardiopatia, il che ne impedisce l'uso come test di screening nei soggetti asintomatici o come metodo diagnostico per l'insufficienza cardiaca congestizia.

Come marcatore del danno e della necrosi del miocardio, la cTnI può essere più adatta come indicatore prognostico nei cani che hanno subito un grave danno o come guida per la terapia ottimale.

Nei cani con DCM clinicamente evidente, la concentrazione di cTnI è correlata alla sopravvivenza.

Rispetto a quelli con concentrazioni più basse, i soggetti con cTnI elevata hanno una probabilità tre volte superiore di essere soppressi eutanasicamente o di venire a morte²⁶.

Impieghi attuali del cTnI-test

- Uomo: diagnosi dell'infarto miocardico acuto;
- Medicina veterinaria: nessun impiego approvato.

Impieghi potenziali del cTnI-test sulla base degli studi condotti in medicina veterinaria

- Valutazione della gravità della malattia nei cani con stenosi subaortica, miocardiopatia e valvulopatia mitralica;
- Valutazione della gravità della malattia nei gatti con miocardiopatia;
- Indicatore prognostico nei cani con miocardiopatia;
- Monitoraggio della risposta al trattamento;
- Valutazione del danno cardiaco dovuto a malattia extra-cardiaca (ad esempio, dilatazione/torsione dello stomaco)

Circostanze nelle quali è improbabile che il cTnI-test risulti utile

- Identificazione degli stadi precoci della cardiopatia;
- Differenziazione delle cause cardiache di dispnea da quelle non cardiache²⁶.

1.3 PEPTIDI NATRIURETICI

Sebbene i peptidi natriuretici abbiano svolto un ruolo importante nell'omeostasi dei fluidi dei vertebrati per diversi milioni di anni, la loro importanza è stata rivalutata solo negli ultimi decenni.

Gran parte di biologi marini, scienziati, medici e medici veterinari si sono interessati alla famiglia degli ormoni natriuretici fin dalla loro scoperta.

I peptidi natriuretici condividono un'origine comune ma, a seguito di affinità recettoriali diverse, svolgono funzioni ormonali distinte.

Il peptide natriuretico di tipo B (BNP) è il membro più studiato della famiglia dei peptidi natriuretici, e con il suo "cleavage" equivalente aminotermine peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP), risultano importanti markers sierici cardiovascolari.

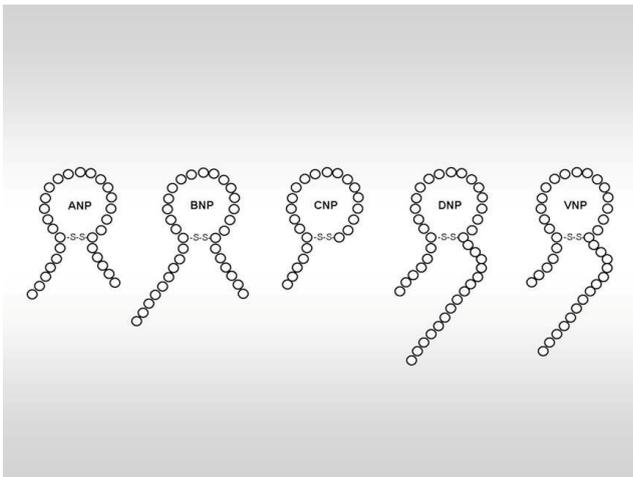
Tuttavia l'interpretazione prognostica e diagnostica, di questi nuovi biomarcatori cardiovascolari, è motivo di discussione sia in medicina umana che in medicina veterinaria²⁷.

Nel 1981, De Bold et al. hanno riportato la loro affascinante scoperta: estratti di tessuto atriale iniettati in ratti inducevano natriuresi²⁸.

L'isolamento del responsabile, in seguito denominato peptide natriuretico atriale (ANP)²⁹, ha spinto ad una moltitudine di ricerche, fino alla scoperta di una nuova classe di ormoni: i peptidi natriuretici (NP).

La famiglia di NP è un gruppo di peptidi, filogeneticamente, funzionalmente e strutturalmente correlato nei vertebrati, la cui principale funzione è il mantenimento dell'omeostasi dei fluidi³⁰.

I membri noti della famiglia NP finora sono: il peptide natriuretico atriale (ANP) con il suo alter-ego renale urodilatina, il peptide natriuretico di tipo B (BNP), il peptide natriuretico di tipo C e le sue 4 differenti isoforme, il peptide natriuretico Drendroaptis (DNP) e il peptide natriuretico ventricolare (VNP), quest'ultimo probabilmente espresso solo nei pesci.



Le strutture di questi peptidi sono rappresentate in Fig. 1.3.1

Tutti i NP sono sintetizzati come pre-pro-ormoni e hanno una struttura ad anello di 17 aminoacidi con una coda amino-terminale comune; con l'eccezione degli isotipi CNP, tutti i NP presentano anche una porzione carbossil-terminale³¹.

ANP, BNP e VNP sono prodotti principalmente dai cardiomiociti, CNP è per lo più espresso nel cervello e nell'endotelio, mentre DNP è stato finora trovato solo nel veleno del serpente "Green Mamba".

Le azioni dei NP sono mediate da una serie di specifici recettori peptide natriuretico (NPR), e variazioni negli effetti dei diversi NP dipendono principalmente le differenze di espressione e di produzione locale.

Tuttavia sono importanti anche i loro tassi di degradazione e di clearance.

Il peptide natriuretico atriale (ANP) è prodotto principalmente nei due atri: la produzione e il rilascio di ANP sono in genere attivati da un aumento della tensione della parete atriale, a seguito di un aumento di volume o di pressione intravascolare.

Differentemente dal BNP, la cui produzione è up-regolata rapidamente quando i cardiomiociti sono stimolati, l'ANP è memorizzata in granuli che rilasciano il loro contenuto in circolo dopo stimolazione³².

I ventricoli del cuore adulto, normalmente, producono solo piccole quantità di ANP; questa produzione è maggiore nel tessuto ventricolare dei feti o neonati.

Un incremento dell'ANP si riscontra anche in soggetti con sovraccarico volumetrico o pressorio^{28 30, 33}.

Un'altra tipologia di ANP è prodotta nei reni ed è chiamata urodilatina.

Questo peptide è stato, originariamente, isolato nelle urine, a causa di un collegamento alternativo della molecola precursore (proANP), che ha una coda amino-terminale più lunga di 4 amminoacidi, rispetto al suo equivalente atriale³⁴.

L'urodilatina è prodotta nei tubuli renali distali e ha solo una funzione locale nella regolazione del sodio e del volume renale.

BNP, ora chiamato peptide natriuretico di tipo B (ma originariamente identificato nel cervello suino e chiamato peptide natriuretico cerebrale), si trova ovunque nel tessuto miocardico, ma in particolare è presente nei ventricoli^{35, 36}.

In contrasto con ANP, che ha nell'uomo un'emivita in vivo di 3 minuti, a causa di una minore sensibilità, sia verso il recettore di clearance sia verso gli enzimi di degradazione, il BNP è un peptide più stabile con un'emivita in vivo nell'uomo di 20 min, questo ne rende più facile la misurazione^{37, 38}.

CNP è un fattore paracrino o autocrino che predomina nelle cellule endoteliali vascolari, nel sistema nervoso centrale, rene, condrociti e ghiandola pituitaria dei mammiferi. Le concentrazioni plasmatiche sono basse, ma l'espressione tissutale è alta, coerente con un suo ruolo paracrino^{39, 40}. Si pensa che abbia una funzione di neurotrasmettitore nel sistema nervoso centrale, mentre svolge anche un ruolo nella regolazione del tono vascolare^{41, 42}. Inoltre, CNP inibisce l'attivazione dei fibroblasti e previene lo sviluppo di fibrosi in un modo superiore all'ANP e al BNP ma, manca di azioni natriuretiche o diuretiche^{39, 43}.

DNP è l'unico NP, che è stato isolato soltanto dalla ghiandola del veleno del serpente "*Green Mamba*"⁴⁴, che è uno dei serpenti più velenoso al mondo.

DNP è strutturalmente molto simile a VNP in termini di lunghezza del frammento C-terminale della coda.

Anche se la sua funzione finora rimane sconosciuta, l'effetto vasorilassante di DNP può potenziare l'assorbimento del veleno neurotossico del Mamba verde.

È stato dimostrato che i livelli circolanti di peptidi, simili al DNP, corrispondano alla gravità dell'insufficienza cardiaca nell'uomo; sono in corso studi sulle possibili applicazioni terapeutiche del DNP.

VNP gioca un ruolo importante nella omeostasi dei fluidi delle razze di pesci osteoittici, con pinne come anguille e salmonidi, ed è largamente espresso nei loro apparati cardiaci.

STORIA BNP

Nel 1981, la scoperta rivoluzionaria di De Bold, che il cuore possedesse anche una funzione endocrina, ha modificato la visione della fisiologia e della funzione cardiaca.

In realtà era già nota, fin dalla fine degli anni '50, la presenza di granuli di secrezione nei miociti dell'atrio, ma solo 25 anni dopo, è stato dimostrato che il contenuto di questi "granuli atriali specifici"⁴⁵ induceva un effetto diuretico e natriuretico.

In seguito, con la purificazione ed il sequenziamento dell'ormone peptidico effettore di questa attività endocrina, denominato Atrial Natriuretic Factor²⁸, si aprì la strada all'identificazione di una famiglia di peptidi natriuretici e vasodilatatori, conosciuti poi con il nome di peptidi natriuretici atriali (ANP). Successivamente, è stato dimostrato che i miocardiociti ventricolari sono in grado di produrre e secernere un peptide ad attività endocrina con effetto natriuretico, il Brain Natriuretic Peptide (BNP), oggi denominato peptide natriuretico di tipo B (BNP)³⁵.

Il peptide natriuretico di tipo B è composto da 32 aminoacidi (aa).

Sia il BNP che l'ANP non sono prodotti direttamente in questa forma ma si trovano nei miocardiociti come prepro-ormone (preproBNP) che è un peptide di 134 aa, che viene privato di 26aa, dando vita ai pro-peptide, (nel nostro caso al pro-BNP)⁴⁶.

Al momento del rilascio, viene scisso per via enzimatica da delle serinproteasi denominate Furina⁴⁷ e Corina, nel peptide N-terminale di 72 aa (NT-proBNP) ed nel peptide C-terminale biologicamente attivo di 32 aa (BNP) (Fig 1.3.2).

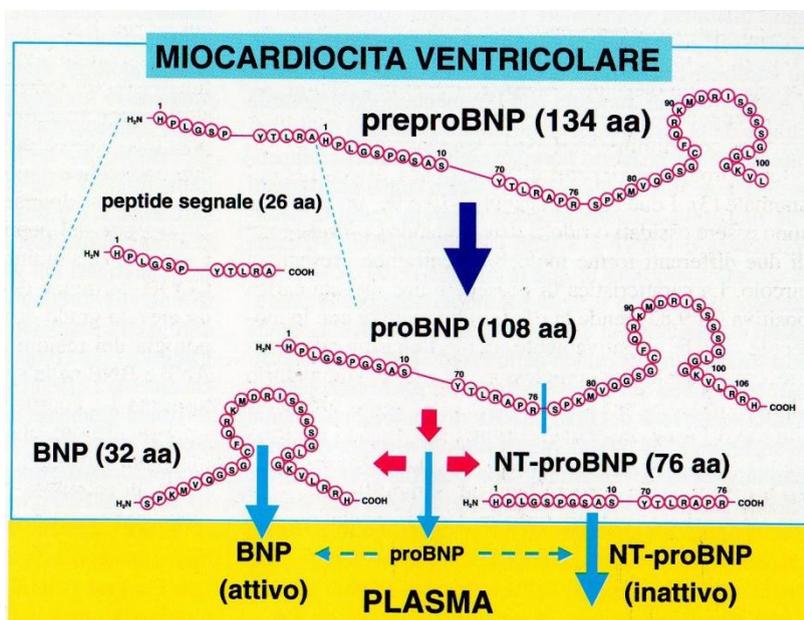


Figura 1.3.2 Struttura e sintesi dei peptidi natriuretici cardiaci circolanti nel sangue

Tutti questi peptidi (proBNP, NT-proBNP e BNP) si possono isolare nel plasma, anche se sono principalmente il BNP e l'NT-proBNP ad essere dosati a scopi clinici.

I due ormoni, derivando dalla scissione proteolitica della medesima molecola, il pro-BNP, sono secreti in concentrazioni equimolari.

Il BNP ha però un'emivita più breve rispetto all'NT-proBNP (circa 60-120 minuti per l'NT-proBNP e circa 20 minuti per il BNP), che risulta nella presenza di concentrazioni più alte del frammento aminotermine, rispetto all'ormone biologicamente attivo.

Per questa ragione la prima sembra più indicata nel caso di alterazioni avvenute nell'immediato, mentre l'NT-proBNP risulta essere meno variabile a misurazioni nelle fasi acute⁴⁸.

Inoltre l'NT-proBNP sembra essere più stabile durante i processi di refrigerazione, rispetto al BNP ed avere una variabilità biologica leggermente inferiore^{49, 50}.

L'ANP è secreto principalmente dai cardiomiociti atriali, mentre il BNP da quelli ventricolari, soprattutto in corso di scompenso cardiaco cronico.

Dal punto di vista patogenetico, lo stiramento della parete atriale è il più importante stimolo per la sintesi e la secrezione dell'ANP.

I cardiomiociti atriali immagazzinano il pro-ormone (pro-ANP), sotto forma di granuli e lo convertono nella parte attiva prima della secrezione.

In condizioni fisiologiche, la maggior parte delle molecole di ANP e BNP circolanti derivano dall'atrio.

In condizioni di stress cronico, invece, la concentrazione di BNP aumenta maggiormente rispetto al valore dell'ANP circolante, poiché la massa ventricolare è più grande di quella atriale e quindi la secrezione del BNP supera quella dell'ANP.

Lo stiramento della parete atriale è il più importante stimolo per la secrezione degli ormoni natriuretici, per cui ogni condizione, anche fisiologica, associata ad un incremento acuto del ritorno venoso può causare un aumento dei valori plasmatici di ANP e BNP.

Il meccanismo d'azione dei PN è rappresentato da un'azione diuretica, natriuretica e vasodilatatrice, accompagnata da un'azione inibitoria sulla capacità contrattile dei cardiomiociti, sul rimodellamento cardiaco e sui processi infiammatori del tessuto miocardico.

Essi hanno, quindi, un'azione protettiva sul sistema cardiaco, non solo come ormoni circolanti, ma anche come fattori locali antifibrotici ed antiipertrofici. Tale meccanismo, assume un'importanza fondamentale se si considera che la fibrosi è una causa essenziale di rimodellamento cardiaco in corso di scompenso cronico e che esiste una correlazione tra il livello di PN circolanti e il grado stesso di rimodellamento.

Un'ulteriore conferma di tale correlazione è rappresentata dal fatto che, entrambi i meccanismi descritti, (fibrosi e rilascio dei PN) sono favoriti dallo stiramento delle fibre miocardiche.

Inoltre, i PN interagiscono con il sistema neuro ormonale, quello neuroendocrino ed il sistema immunitario.

Tutte queste osservazioni mostrano come la secrezione dei due peptidi non sia limitata solo al comparto cardiaco, ma si può riscontrare anche in corso di malattie primitivamente non cardiache, quali ad esempio malattie respiratorie acute e croniche, malattie renali, cirrosi epatica, shock settico, malattie infiammatorie, sindromi paraneoplastiche etc.

Inoltre, qualsiasi "danno" o insulto a livello cellulare che comporti il rilascio di costituenti sarcoplasmatici, come ad esempio sostanze tossiche, traumi chirurgici, necrosi ischemica, provoca un incremento dei livelli plasmatici di PN circolanti.

La biochimica del peptide natriuretico atriale (ANP) e del peptide natriuretico cerebrale (BNP) è complessa e ci sono notevoli differenze tra gli esseri umani e gli animali da compagnia che devono essere considerate⁵¹.

C-terminale ANP suino, canino, bovino e ovino sono caratterizzate da una identica sequenza di 28 aminoacidi composta da un anello di 17 aminoacidi chiuso da un legame disolfuro tra due residui di cisteina.

Come risultato, sono stati progettati dei test per misurare il frammento C-terminale ANP nell'uomo ed applicarlo allo studio nei cani.

Tuttavia, per la misura del BNP, la situazione è più problematica.

In contrasto con l'omologia dimostrata dall'ANP nelle diverse specie, la struttura del N-terminale proBNP e C-terminale BNP è sostanzialmente più variabile nei mammiferi.

Per questo motivo, il test BNP umano non può essere utilizzato nei cani.

Maggiore omologia è stata evidenziata nella struttura del BNP suino e canino.

Molti ricercatori utilizzano un saggio C-terminale BNP porcino per misurare i livelli di BNP nei cani, ma questo approccio è probabilmente meno sensibile utilizzando anticorpi sintetizzati contro la regione N-terminale del BNP canino⁵².

Bnp in medicina umana

Il gruppo di Maisel ha dimostrato che il peptide natriuretico di tipo B (B-type natriuretic peptide, BNP) è uno strumento accurato per stabilire o escludere la diagnosi di scompenso cardiaco congestizio, in pazienti che si presentano al pronto soccorso con dispnea acuta⁵³.

Altri studi clinici importanti hanno confermato l'accuratezza di questo peptide nel differenziare le cause cardiache da quelle polmonari di dispnea, sottolineando soprattutto il suo valore come test di *rule-out*, cioè di esclusione, visto il suo alto valore predittivo negativo⁵⁴⁻⁵⁶.

I peptidi natriuretici cardiaci, quindi, sono stati inseriti nelle linee guida, sia americane che europee, per la diagnosi e per il trattamento dello scompenso cardiaco, acuto e cronico^{57,58}.

Le linee guida europee riportano che il BNP e il frammento aminoterminale del proBNP (NT-proBNP) sono utili nella diagnosi di scompenso cardiaco, con un considerevole potenziale prognostico, mentre per quanto riguarda un possibile ruolo nel monitoraggio del trattamento, la questione rimane tutta da delineare.

Nell'ambito clinico, NT-proBNP risulta essere la molecola più stabile, mentre il BNP presenta una migliore correlazione con le condizioni fisiologiche o cliniche, in seguito a variazioni emodinamiche acute^{59,60}.

BNP e NT-proBNP, comunque, hanno dimostrato accuratezza largamente sovrapponibile, nell'escludere la presenza di disfunzione sistolica grave e nel predire la presenza di scompenso cardiaco, nonostante l'influenza del sesso, dell'età e della funzione renale sui livelli di entrambi i peptidi⁶¹.

Nonostante questa premessa, però, devono essere tenuti in considerazione alcuni importanti fattori quando si utilizzano BNP e NT-proBNP per la diagnosi o l'esclusione di insufficienza cardiaca.

Entrambi i peptidi sono influenzati dall'indice di massa corporea (BMI) e dalla compromissione della funzione renale, rendendo le concentrazioni di BNP e di NT-proBNP rispettivamente inferiori e superiori⁶².

L'obesità, di solito descritta negli esseri umani come un aumento del BMI, sorprendentemente, è stato trovato correlato a bassi livelli di BNP⁶³, nonostante le maggiori pressioni finali di riempimento diastolico ventricolare sinistro nei pazienti obesi⁶³, anche se è stato ipotizzato che questo può essere dovuto ad un aumento dell'attività dei recettori dei peptidi natriuretici di tipo C (NPR-C) nel tessuto adiposo.

Nei pazienti umani, sottoposti a chirurgia bariatrica, è stato riscontrato un aumento delle concentrazioni di BNP e NT-proBNP, mentre il BMI diminuiva⁶³.

Das et al. hanno scoperto che la relazione inversa tra BNP e NT-proBNP con BMI sembra essere mediata dalla massa magra piuttosto che dalla massa grassa.

E' stato ipotizzato che una sostanza prodotta nella massa magra, possibilmente dagli androgeni⁶⁴, sopprima la sintesi o il rilascio di pre-proBNP dai cardiomiociti.

Per quanto riguarda le patologie renali, è stato scoperto che, i pazienti con questo problema avevano dei valori superiori di BNP e NT-proBNP.

Gli studiosi si sono chiesti se questa associazione si basasse su una riduzione della clearance renale di queste molecole, o se riflettesse la forte interazione tra la disfunzionalità cardiaca e quella renale, chiamata anche "sindrome cardio-renale"⁶⁵.

Ritornando agli usi dei due peptidi in medicina umana si ricorda che, qualora si volessero utilizzare i test BNP o NT-proBNP per la diagnosi di insufficienza cardiaca congestizia in pazienti con sintomi e segni respiratori ambigui, le concentrazioni dei due peptidi non dovrebbero essere interpretate in modo rigido, perché la forza del test diminuisce con l'aumentare di altre indagini cliniche come: anamnesi, esame fisico, radiografia ed ecocardiografia⁶⁶.

Al contrario, nei casi in cui i test tradizionali risultino dubbi, l'aggiunta del test NT-proBNP per la valutazione clinica, migliora l'accuratezza della diagnosi^{67, 68}.

Dunque, se usato nel contesto di un sano giudizio clinico e con in mente l'ampio ventaglio di diagnosi differenziali, sia BNP che NT-proBNP hanno dimostrato di avere un alto valore nell'identificazione o esclusione di casi di insufficienza cardiaca^{54 69}.

Un'ulteriore indicazione all'uso del test BNP o NT-proBNP è quello di stratificare il rischio di morbilità e mortalità nei pazienti⁴⁶.

Nei soggetti umani, il rischio di morte aumenta del 35% per ogni aumento di 100ng/L del range per il BNP⁷⁰.

Misurazioni seriali, che rilevano valori > del 85 % o < del 46% dei range per BNP o NT-proBNP, si possono associare, rispettivamente, ad un peggioramento o a un miglioramento dello stato clinico del paziente e del rischio di morte⁷¹.

I soggetti con malattia della valvola mitralica precoce, con concentrazioni elevate di BNP, avevano una probabilità di morte o di insufficienza cardiaca congestizia 4,7 volte maggiore rispetto ai pazienti con concentrazioni di BNP nella norma⁷².

Bnp in medicina veterinaria

Praticità e limitazioni di NT-proBNP

Il test NT-proBNP, come molti test diagnostici ha alcune limitazioni, correlate in particolar modo alla presenza di malattie concomitanti, alla somministrazione di farmaci (diuretici) che possono alterare il volume dei fluidi, ed alla notevole variabilità settimanale delle concentrazioni plasmatiche dell'ormone. Inoltre la stabilità nel siero canino di NT-proBNP è altamente influenzato dal tempo e dalla temperatura⁴⁶.

Funzione renale

Negli esseri umani BNP e l'NT-proBNP sono in parte escreti attraverso la filtrazione renale; pertanto, livelli circolanti di questi biomarcatori,

possono essere elevati nei soggetti con disfunzione renale e diminuita velocità di filtrazione glomerulare.

Negli studi veterinari di Schmidt⁷³ e Raffan⁷⁴, è stata riscontrata una concentrazione media di NT-proBNP più alta nei cani con iperazotemia rispetto ai controlli sani.

La differenza di concentrazione di NT-proBNP tra questi gruppi, era maggiore di 2,4-4,7 volte nei cani affetti da patologia renale.

In entrambi gli studi, la presenza di azotemia spesso era sufficiente per far aumentare la concentrazione di NT-proBNP al di sopra del normale range di riferimento, classificando così i cani erroneamente come positivi. Questo risultato può essere regolato tramite l'elaborazione di valori corretti per l'azotemia (NT-proBNP/creatinina)⁷³.

È probabile che, elevate concentrazioni di NT-proBNP non siano unicamente il risultato di una minore filtrazione renale, ma questa situazione possa verificarsi secondariamente ad una disfunzione diastolica e un aumento del volume plasmatico, con conseguente stiramento miocardico aumentato.

Iperensione sistemica e/o polmonare sono entrambe associate con aumenti di NT-proBNP^{75, 76}.

Nella cosiddetta sindrome cardio-renale⁷⁷, che è un'entità clinica complessa caratterizzata da concomitante disfunzione cardiaca e renale, si possono ritrovare aumenti di NP.

Nei cani⁷⁴, l'assenza⁷³ o la debole correlazione⁷⁸ tra NT-proBNP e creatinina sierica, supporta la teoria che l'NT-proBNP non è semplicemente il risultato di una diminuita filtrazione glomerulare.

Così, nei pazienti con malattia renale, elevati livelli di BNP o NT-proBNP, possono, comunque, fornire informazioni prognostiche importanti.

Variabilità biologica

A differenza dell'ANP, un minimo di BNP viene, comunque, immagazzinato prima del rilascio.

La secrezione del BNP è modulata da un aumento nella trascrizione, che richiede un periodo sufficientemente lungo (generalmente 1-3 ore), tra lo stimolo iniziale per il rilascio e l'aumento dei livelli in circolo⁷⁹.

Oyama⁸⁰ afferma che, nei pazienti sani, esiste una variabilità settimanale nelle concentrazioni di NT-proBNP che può determinare fluttuazioni di alcuni soggetti verso la falsa positività o negatività.

Queste oscillazioni possono derivare da una variazione della produzione del NT-proBNP, correlato al ritmo circadiano, cambiamenti nella dieta, assunzione di acqua, esercizio fisico e alla clearance del peptide stesso^{81, 82}; questa variabilità andrebbe sempre tenuta in considerazione nel momento dell'interpretazione dei risultati.

Table 1 Potential indications for BNP or NTproBNP testing in humans and dogs		
Indication	Evidence in Humans ^{4,6}	Evidence in Dogs
Diagnosis of heart failure	Strong	Moderately strong ²¹⁻²⁴
Patients with ambiguous signs	Strong	Moderately strong
Patients with suspicious signs	Moderately strong	Moderately strong
Patients with obvious heart failure signs	Not useful	Not useful
Detection of occult left ventricular dysfunction	Moderate	
High-risk populations	Moderate	Moderate ³⁰⁻³²
General population screening	Not useful	Likely not useful
Risk stratification and prognostication	Strong	Moderately strong ¹⁷⁻¹⁹
Biomarker-guided therapy	Unknown	Few data available ⁴⁰

Fig.1.3.3 Indicazioni potenziali dell'uso di BNP o NT-proBNP nell'uomo e nei cani⁴⁶

NT-proBNP in cani con sintomi respiratori

Il test NT-proBNP è particolarmente indicato nei cani con sintomi respiratori di causa sconosciuta^{75, 83}.

Spesso i dati raccolti dall'anamnesi e i segni clinici non riescono a indicare chiaramente se la causa primaria della dispnea è da associarsi ad una patologia respiratoria o ad un'insufficienza cardiaca congestizia.

Nei cani geriatrici è comune il ritrovamento concomitante di endocardiosi delle valvole atrio-ventricolari e difficoltà respiratoria.

In questi soggetti, la presenza di un soffio cardiaco, potrebbe indurci a ritenere la patologia cardiaca il problema principale, anche se, questo sillogismo non è sempre corretto.

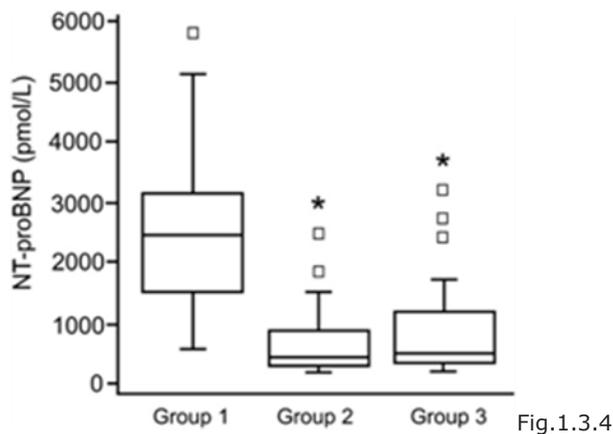
Nello studio di Fine e colleghi⁸³, sono stati esaminati 46 cani con difficoltà respiratoria o tosse: la concentrazione media di NT-proBNP era, significativamente più alta nei cani con insufficienza cardiaca rispetto ai cani con malattie respiratorie come la bronchite cronica, infezioni o neoplasie.

Nei 21 cani con malattie respiratorie, infatti, le concentrazioni di NT-proBNP erano inferiori a 800 pmol/L, conferendo a questo valore, il 100 % di specificità per le patologie polmonari.

In 23 su 25 pazienti (92%) con insufficienza cardiaca, invece, le concentrazioni di NT-proBNP erano superiori a 1400 pmol/L.

Nello studio di Oyama⁴⁶, la concentrazione di NT-proBNP era maggiore di 1158 pmol/L, nei soggetti con patologia cardiaca congestizia, permettendo di differenziare, con una notevole accuratezza, i pazienti affetti da patologie respiratorie da quelli con insufficienza cardiaca.

In questo studio è stato incluso un ulteriore gruppo di cani (gruppo 3) che presentavano contemporaneamente malattia respiratoria e un'endocardiosi asintomatica: la concentrazione media dell'ormone in questi pazienti era sovrapponibile a quelli con patologie respiratorie (Fig.1.3.4)⁴⁶.



Gruppo 1: patologia cardiaca

Gruppo 2: patologia respiratoria

Gruppo 3: patologia respiratoria +MMVD

Studi come questi cercano di dicotomizzare lo stato clinico del paziente, questo è facilitato dal fatto che si hanno solo due opzioni: patologia cardiaca o non cardiaca, utilizzando solo una variabile continua ad esempio la concentrazione di NT-proBNP.

Valori inferiori a 900 pmol/L sono altamente specifici di malattia respiratoria, valori approssimativamente superiori a 1800 pmol/L sono altamente specifici di insufficienza cardiaca congestizia, mentre i valori intermedi, (tra 900 e 1800 pmol/L) hanno valore predittivo e clinico minore e devono essere interpretati con maggior cautela.

Nello studio clinico di Fine, Oyama^{83,75} e di Januzzi e Maisel^{68,54}, bisogna sempre aver presente che, il test gold standard per la diagnosi di CHF o malattie respiratorie è lo studio del quadro clinico del paziente (anamnesi, segni clinici, radiografie, elettrocardiogrammi, ecocardiogrammi e diagnostica di secondo livello).

L'ottica nella quale deve essere inserito il test NT-proBNP è di associarlo agli altri test diagnostici, più comunemente usati nella pratica clinica, e non come loro sostituto; con l'aumentare della competenza dei vari studi diagnostici convenzionali, si assiste ad una diminuzione del valore predittivo dei test con i biomarkers.

Dunque, in questo momento il massimo valore del test NT-proBNP è quello usato nei pazienti la cui storia clinica risulta ambigua⁶⁶.

Per i pazienti umani, con insufficienza cardiaca congestizia arrivati al pronto soccorso, il test Nt-proBNP è risultato molto importante nella corretta classificazione dei pazienti nel triage, ed è probabile che questo possa rivestire la stessa importanza anche in campo veterinario.

NT-proBNP in cani con sospetta patologia cardiaca

Un'altra indicazione potenziale per il test NT-proBNP è il rilevamento di malattie cardiache asintomatiche o occulte.

Durante questa fase, la diagnosi precoce potrebbe essere un valido aiuto per monitorare la progressione ed, eventualmente, intervenire prima dell'insorgenza dei segni clinici.

Nel caso della cardiomiopatia dilatativa occulta (DCM), il test NT-proBNP può avere valore in caso di ritrovamento di reperti come di soffi cardiaci che risultano dubbi.

Inoltre, i test gold standard utilizzati per la cardiomiopatia occulta, come l'esame elettrocardiografico (ECG) e gli esami ecocardiografici, sono relativamente costosi e richiedono competenze e attrezzature supplementari.

Nei Dobermann, il test BNP possiede una sensibilità relativamente alta (95,2 %), ma una bassa specificità (61,9 %), quindi, sarebbe normale aspettarsi molti falsi positivi, limitando così l'utilità del test.

Wess e colleghi⁸⁴, hanno esaminato 324 cani Doberman e hanno scoperto che il test NT-proBNP possedeva bassa sensibilità e specificità (rispettivamente 76,1 % e 76,9 %) nel confermare le anomalie rilevate, rispetto all'ecocardiografia o all'ECG.

Tuttavia, nei cani con anomalie ecocardiografiche, la sensibilità saliva al 90%.

Nello studio di Singletary⁸⁵, in 71 cani Dobermann, la combinazione del test NT-proBNP e del monitoraggio con Holter ha dato dei risultati con una sensibilità del 100%, una specificità del 93,2 % e una precisione del 94,4%, nel rilevare 19 cani affetti.

Pertanto, è possibile che il test NT-proBNP, insieme ad un monitoraggio Holter e ad uno studio elettrocardiografico, risulti la combinazione ottimale per la diagnosi di cardiomiopatia dilatativa occulta nei dobermann, razza in cui la prevalenza della malattia è alta⁸⁶.

Il test NT-proBNP rivela informazioni specifiche del paziente in un determinato momento e non si può escludere che quel soggetto non soffrirà mai di quella patologia.

Nonostante ciò, NT-proBNP può giocare un ruolo importante come screening iniziale in animali che appartengono ad una popolazione ad alto rischio⁴⁶.

NT-proBNP per stratificare il rischio

I medici veterinari possiedono una limitata capacità di predire il rischio di morbilità e mortalità nei cani con malattie cardiache.

E' stato dimostrato, nello studio di Tarnow⁸⁷, che la concentrazione del peptide natriuretico aumenta con l'aumentare della gravità della malattia nei cani con presenza o assenza di segni clinici nella loro storia⁴⁸.

Numerosi studi sono stati condotti sulla stratificazione del rischio e, la maggior parte di questi, riguardano soggetti con MMVD come verrà illustrato nel capitolo 3.1; comunque, è possibile che biomarcatori come NT-proBNP possano prevedere, con precisione, quando è prevista l'insufficienza cardiaca o la mortalità.

Questi studi forniscono un assaggio di come questi biomarkers potrebbero avere tutte le potenzialità di dare informazioni, clinicamente importanti, sulla stratificazione del rischio.

Nonostante ciò, sono necessari ulteriori studi per definire meglio gli scopi diagnostici e il target di pazienti, ma è chiaro che la previsione di rischio nei cani con malattia della valvola mitrale ha un grande impatto potenziale, soprattutto se si può dimostrare che, dopo l'identificazione dei pazienti ad alto rischio, l'intervento può favorevolmente modificare la storia naturale della sua malattia.

Gli autori considerano questa indicazione come uno dei più importanti usi potenziali del test NT-proBNP⁴⁶.

In uno studio di Morris⁸⁵, i cani Dobermann con DCM e concentrazione di NT-proBNP elevata, avevano una sopravvivenza media che era 6 volte minore rispetto ai soggetti con concentrazioni più basse.

Nello studio di Noszczyk-Nowak⁸⁸, NT-proBNP aveva predetto la sopravvivenza di cani con DCM, 60 giorni dopo il primo esame. Nei cani con cardiomegalia, confermata tramite radiografia o ecocardiografia, elevate concentrazioni di NT-proBNP, dovrebbero attirare l'attenzione del clinico, al fine di individuare al più presto l'eventuale insorgenza dei primi segni di CHF.

Negli animali ad alto rischio di CHF, il consiglio da dare ai proprietari è quello di monitorare la frequenza respiratoria del cane a riposo.

In cani sani la frequenza respiratoria media durante la notte è di 13 atti al minuto e raramente supera i 30 apm.

Più di 41 atti respiratori al minuto sono un indicatore sensibile per il rilevamento di CHF⁸⁹.

NT-proBNP per guidare la terapia

Un'indicazione finale per l'impiego di NT-proBNP è l'uso in una terapia personalizzata e guidata in base ai livelli dei biomarkers riscontrati.

Secondo l'esperienza degli autori, in genere la risoluzione dell'insufficienza cardiaca congestizia, determina una diminuzione delle concentrazioni di NT-proBNP, ma non al di sotto del normale range di riferimento.

Risulta, comunque, sconosciuto il fatto che, aumentando la terapia e rendendola più aggressiva, per cercare di ridurre ulteriormente le concentrazioni di NT-proBNP, potrebbe cambiare la progressione della malattia o la probabilità di recidiva di scompenso cardiaco.

Anche in umana i risultati di tale evoluzione risultano dubbi⁴⁶.

1.4 SEROTONINA

Il sistema serotoninergico

La serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) è un neurotrasmettitore appartenente alla classe di composti aromatici detti indoli, che presentano un anello a cinque atomi contenente azoto condensato con un anello benzenico.

Questa molecola è un neurotrasmettitore sintetizzato nelle cellule enterocromaffini dell'apparato gastrointestinale e nei neuroni serotoninergici del sistema nervoso centrale (SNC)^{90, 91}.

La biosintesi della serotonina prevede come prima tappa l'idrossilazione del triptofano in posizione 5 per formare il 5-idrossi-triptofano (5-HTP), reazione catalizzata dall'enzima triptofano idrossilasi (TPH).

Questo enzima esiste in due isoforme che hanno una differente distribuzione nell'organismo: la TPH1 è localizzata prevalentemente nei tessuti periferici, nei fotorecettori dell'occhio e nella ghiandola pineale; la TPH2 è presente esclusivamente nei neuroni serotoninergici del SNC.

La 5-HTP viene decarbossilata dall'enzima 5-idrossitriptofano decarbossilasi a 5-HT.

La 5-HT viene catabolizzata ad acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA) tramite l'azione delle monoamminossidasi A (MAOA) (Figura 1.4.1).

La serotonina produce i suoi effetti attraverso una varietà di recettori transmembrana, presenti sia nel SNC che nel sistema nervoso periferico e in tessuti non neuronali, quale l'intestino e il sistema cardiovascolare.

I recettori per la serotonina sono suddivisi in 7 classi (da 5-HT1 a 5-HT7) distinte in base alle caratteristiche strutturali, funzionali e farmacologiche⁹².

La serotonina, come tutte le ammine biogene, dopo il loro rilascio nel vallo sinaptico, termina la sua azione grazie all'attività di specifici trasportatori, localizzati sulla membrana plasmatica, che ne mediano il "reuptake" cioè la ricaptazione.

Il trasportatore specifico della serotonina si chiama SERT ed appartiene alla famiglia dei trasportatori dei neurotrasmettitori Na^+/Cl^- -dipendenti; esso modula i livelli di serotonina nell'ambiente extracellulare, regolando, in tal modo, anche l'attivazione dei recettori⁹³.

Nel citosol la serotonina viene internalizzata, tramite l'azione di trasportatori vescicolari di monoammine (VMAT), in vescicole di deposito, dove viene conservata fino al momento del rilascio⁹⁴.

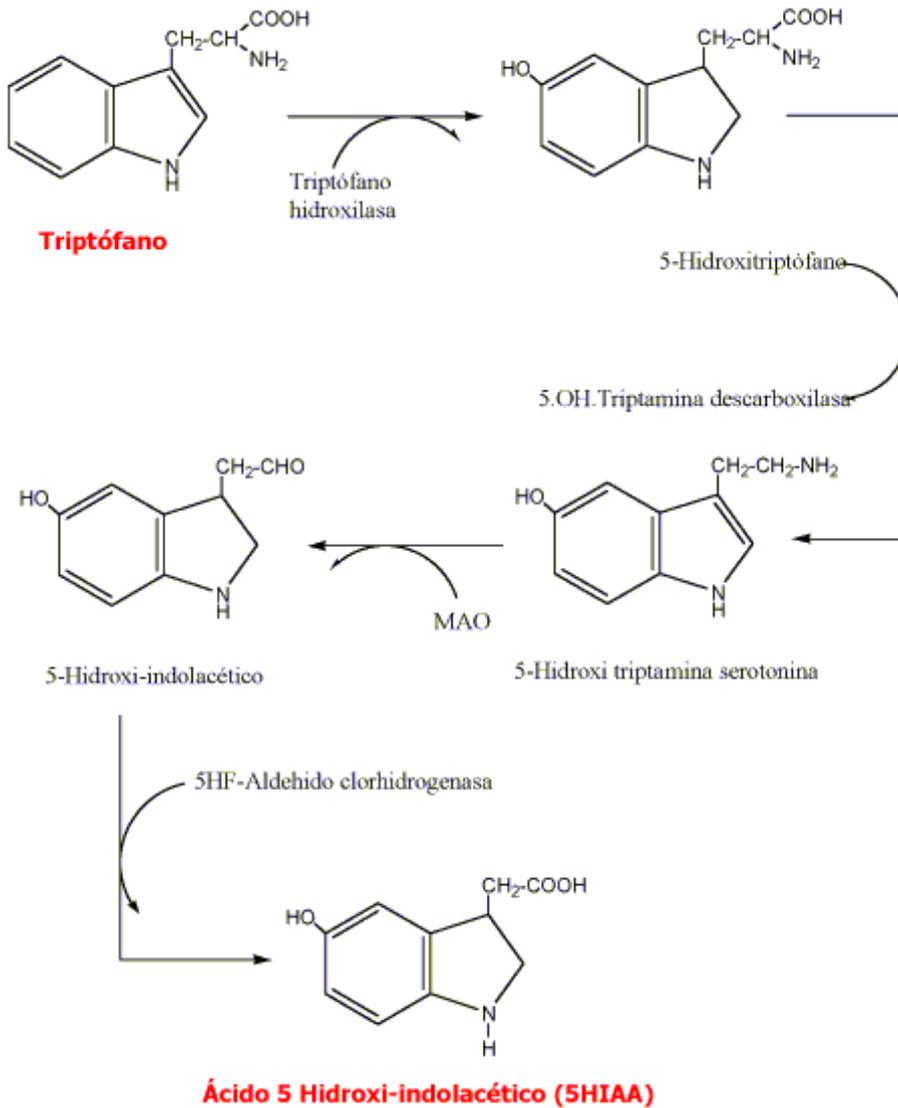


Fig.1.4.1 Biosintesi e degradazione della serotonina

Il sistema serotonergico è il primo ad apparire nell'embriogenesi precoce sia dei vertebrati che degli invertebrati, prima ancora del differenziamento del sistema nervoso, ed è proprio in questa fase che, la serotonina raggiunge i suoi livelli più elevati di concentrazione^{95, 96}.

Negli ultimi anni sono emerse numerose evidenze a sostegno dell'ipotesi che la serotonina, prima di agire quale neurotrasmettitore per l'encefalo adulto, rappresenti un fattore determinante nella modulazione della plasticità sinaptica e dello sviluppo sia del SNC che di altri tessuti.

I neuroni serotonergici, infatti, sono tra i primi a formarsi durante lo sviluppo embrionale e la serotonina viene rilasciata dagli assoni in crescita prima che le sinapsi siano completamente formate⁹⁶.

Nel SNC dei vertebrati la maggior parte dei neuroni che producono serotonina sono localizzati tra mesencefalo e romboencefalo.

La serotonina è sintetizzata anche nei fotorecettori della retina, nella ghiandola pineale, ed a livello periferico, nelle cellule enterocromaffini dell'intestino, nei tessuti neuroepiteliali dei polmoni e nelle cellule parafollicolari della tiroide.

Essa è una delle più importanti molecole presenti nell'intestino, all'interno delle cellule enterocromaffini, dove si ritrova circa il 90% del contenuto totale di serotonina corporea⁹⁰.

Nello sviluppo dei mammiferi, molto precocemente, è stata riscontrata la presenza di serotonina a livello del cuore, del mesenchima craniale e della notocorda⁹⁷.

Più tardivamente nell'embriogenesi, quando i neuroni serotonergici sono differenziati, si riscontra la presenza di serotonina nel talamo, nella corteccia limbica, nell'ipotalamo, nella retina e nel nucleo olivare superiore⁹⁸.

Infine, nell'organismo adulto si riscontra la presenza di serotonina nelle piastrine che la ricaptano dal circolo sanguigno e la rilasciano quando sono attivate⁹⁹.

La serotonina regola numerosi processi fondamentali sia durante lo sviluppo embrionale che nell'organismo adulto.

Tra le funzioni fisiologiche regolate dalla serotonina vi sono i processi della memoria, il ciclo sonno-veglia, la secrezione neuroendocrina, il comportamento sessuale, l'appetito, l'attività motoria, la termoregolazione e il dolore¹⁰⁰.

La serotonina svolge, inoltre, un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività degli apparati respiratorio, cardiovascolare e gastrointestinale^{90, 101, 102}.

Un'alterata regolazione della trasmissione serotoninergica nell'uomo ha effetti su numerosi aspetti comportamentali ed è la causa di disordini dell'alimentazione e di patologie neuropsichiatriche^{103, 104}.

Molte sostanze che modulano il sistema serotoninergico, sono alla base dei trattamenti farmacologici per tali malattie.

Alterazioni dei livelli di serotonina sono ritenuti responsabili di numerose patologie dell'uomo e degli animali che comprendono disordini cardiaci, malattie gastrointestinali, tumori, miopatie e numerose altre^{90, 96, 101, 102}.

I recettori della serotonina

La serotonina è l'unica fra le monoamine biogene ad esercitare la sua azione mediante l'attivazione di 14 distinti recettori, suddivisi in 7 classi sulla base delle caratteristiche strutturali e funzionali^{92, 93}.

Fatta eccezione per il recettore 5-HT₃, che appartiene alla famiglia dei canali ionici, tutti i recettori per la serotonina appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G, e suddivisi in ulteriori 14 sottotipi, rappresentano una delle famiglie più complesse di recettori di neurotrasmettitori.

La famiglia dei recettori 5-HT₁ è composta da cinque membri (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}); di questi, per il nostro interesse sul cuore, verrà ricordato il 5-HT_{1B} che ha effetti sulla vasocostrizione.

La famiglia dei recettori 5-HT₂ è costituita da tre membri: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} dei quali il 5-HT_{2B} ha effetti sul sistema cardiovascolare.

La diffusa espressione del recettore 5-HT_{2B} nell'embriogenesi precoce (cellule della cresta neurale, tubo neurale, cuore, intestino, somiti,

vescicole ottiche, archi faringei, mesenchima cranio-facciale) fa supporre un ruolo fondamentale di 5-HT_{2B} nella morfogenesi mediata dalla serotonina.

I recettori 5-HT₃ appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati a canali ionici e sono costituiti da cinque subunità che delimitano un canale centrale. Tali recettori sono localizzati sui neuroni centrali e periferici, dove essi causano una rapida depolarizzazione in seguito al movimento di cationi da e verso la cellula (Na⁺ e Ca⁺⁺ in entrata e K⁺ in uscita).

I recettori 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ sono accoppiati alla proteina G_s e, tramite l'attivazione dell'enzima adenilato-ciclastasi, promuovono la formazione di cAMP che interagisce con vari bersagli, quali la proteina-chinasi A (PKA) o i canali ionici del calcio¹⁰⁵.

Il trasportatore della serotonina SERT

Il trasportatore specifico della serotonina (SERT) è una proteina integrale di membrana di circa 600 amminoacidi, con dodici domini transmembrana ed i residui carbossi- ed ammino-terminale citoplasmatici⁹³.

Nel dominio idrofilico extracellulare di SERT, tra i domini transmembrana 3 e 4, sono presenti due siti canonici di glicosilazione.

La proteina contiene anche siti di fosforilazione ed, in particolare, tre residui per la PKA e tre per la proteina chinasi C (PKC) che regolano l'attività del trasportatore tramite due sistemi opposti, quello del cAMP e quello del fosfatidilinositolo fosfato (PIP₂).

La PKA quando è attivata dal cAMP induce un aumento della ricaptazione della serotonina, mentre l'attivazione della PKC provoca una riduzione dello stesso¹⁰⁶.

L'espressione di SERT è stata evidenziata in diversi distretti dell'organismo a vari stadi dello sviluppo embrionale⁹³; il primo apparato in cui compare è il gastrointestinale a cui seguono l'apparato cardiovascolare, la pelle, il fegato, la lingua, il tessuto adiposo bruno, il

connettivo, il sistema nervoso periferico, la midollare del surrene, i primordi dei denti, l'orecchio interno, la tiroide.

Nel SNC si ritrova nella retina, nel sistema limbico, nel nucleo cocleare, nel nucleo genicolatolaterale e nella ghiandola pituitaria⁹⁸.

Nell'organismo adulto il trasportatore è localizzato nei polmoni, nell'intestino, nella milza, nei plessi enterico e mioenterico, nella corteccia frontale, nell'ippocampo, nello striato e nel rombencefalo, nella parte posteriore dell'encefalo e in corrispondenza dei nuclei del raphe dove raggiunge i livelli di massima espressione^{98, 107-109}.

Varianti geniche che alterano la funzionalità di SERT nell'uomo producono fenotipi simili a quelli manifestati nel topo¹¹⁰. E' documentato, ad esempio, che la variazione di lunghezza in una sequenza funzionale presente nella regione di controllo della trascrizione del gene di SERT è associata a diverse patologie mentali.

Altre patologie associate ad alterazioni nella funzionalità di SERT, ma non strettamente correlate alle funzioni del sistema nervoso, sono l'infarto del miocardio, l'ipertensione polmonare, la sindrome dell'intestino irritabile e la sindrome della morte infantile improvvisa (SIDS)^{101, 102, 111, 112}.

L'accertato ruolo di SERT, in numerose patologie del sistema nervoso associate ad aspetti emotivi o comportamentali, ha reso tale proteina un bersaglio molto utilizzato nelle terapie farmacologiche.

Gli inibitori selettivi di SERT, i cosiddetti farmaci SSRI, vengono ampiamente utilizzati per la cura della depressione^{98, 113}.

Il sistema serotonergico nel cuore

La serotonina regola le funzioni cardiovascolari sia durante l'embriogenesi che nell'età adulta^{102, 106-108, 114-119}.

Lo sviluppo cardiaco è sotto il costante controllo della serotonina e le cellule cardiache accumulano attivamente la serotonina durante tutto il periodo dello sviluppo embrionale.

Alti livelli di serotonina, infatti, sono stati riscontrati nel miocardio di topi sin dagli stadi embrionali più precoci¹¹⁵.

Nelle prime fasi della gravidanza la serotonina è trasportata attraverso la placenta¹²⁰ e prodotta poi nell'intestino¹²¹ e nel cervello¹²².

I cardiomiociti, tuttavia, sembrano non esprimere l'enzima TPH necessario per la sintesi della serotonina¹¹⁵ per cui l'accumulo di serotonina nei cardiomiociti deriva da un attivo "uptake" della serotonina mediato dal suo trasportatore SERT¹¹⁸.

Nei primi stadi di sviluppo embrionale, l'mRNA di SERT è stato rilevato nelle cellule della cresta neurale e nel cuore¹⁰⁸.

Da studi condotti trattando colture di cardiomiociti fetali con concentrazioni crescenti di serotonina, sembra che l'ammina eserciti un effetto mitogenico su tali cellule e su cellule non muscolari¹²³.

L'effetto della serotonina sulla proliferazione di cellule cardiache si esplica tramite l'attivazione di specifici recettori ed in particolare del recettore 5-HT2B¹⁰⁶.

Studi condotti su topi KO (topi "nulli per SERT") per il recettore 5-HT2B mostrano il ruolo di tale recettore nello sviluppo e nel differenziamento del cuore adulto¹²⁴, mentre il recettore 5-HT1B sembra che sia coinvolto nella proliferazione delle cellule subendoteliali valvolari¹²⁵.

Presidi farmacologici, che agiscono sul sistema serotoninergico, sono stati associati ad un numero significativo di effetti deleteri sul sistema cardiovascolare, quali l'ipertensione cardiovascolare, l'aritmia cardiaca e le anomalie valvolari cardiache^{114, 119, 126-128}.

Nei pazienti con tumori carcinoidi è stata osservata l'associazione di alti livelli di serotonina con una fibrodisplasia principalmente delle valvole cardiache del lato destro¹²⁸.

Tali evidenze ben si correlano al profilo di espressione del gene SERT nel cuore durante lo sviluppo e nell'età adulta¹²⁹.

L'osservazione che topi SERT-KO sviluppano valvulopatie e fibrosi miocardica ha fornito ulteriori chiarimenti sulle patologie cardiache valvolari associate alla serotonina e sul ruolo di SERT nella loro patogenesi¹³⁰.

Il ruolo della serotonina sui tessuti cardiaci delle valvole è esteso e complesso.

L'attivazione, da parte della serotonina, delle vie di trasduzione di segnali mediate dalle proteine G, promuove un aumento di espressione della citochina TGF- β 1^{131, 132}.

E' stato dimostrato che la serotonina promuove segnali fibrotici nelle cellule valvolari interstiziali di pecora in coltura^{133, 134} e nelle cellule mesangiali di rene¹³¹ inducendo l'espressione di TGF- β 1 attraverso una via di traduzione del segnale.

TGF- β 1 è coinvolta nella patogenesi di numerose patologie cardiovascolari, quali l'ipertensione, arteriosclerosi, ipertrofia cardiaca e insufficienza cardiaca¹³⁵.

TGF- β 1 trasmette segnali principalmente attraverso le proteine citoplasmatiche Smad, che traslocano nel nucleo cellulare e agiscono da fattori trascrizionali¹³⁶.

Le proteine Smad svolgono un ruolo importante nel rimodellamento cardiaco e nell'insufficienza cardiaca attraverso la regolazione di processi fibrotici, apoptotici ed anti-ipertrofici¹³⁷.

Membri della famiglia delle protein-chinasi attivate da mitogeni (MAPK) sono coinvolti nelle vie di trasduzione del segnale TGF- β 1/Smad.

Nelle cellule vascolari del muscolo liscio, TGF- β 1 attiva tre MAPK di cui una è la chinasi regolata da segnali extra cellulari (ERK).

E' stata dimostrata un'interazione tra ERK e Smad.

L'inibizione di ERK riduce i livelli di fosforilazione di Smad indotti da TGF- β 1, la produzione di collagene e la sua attività di promotore, indicando che l'attività di ERK è necessaria per un'ottimale risposta a TGF- β 1¹³¹.

Sebbene sia stato dimostrato il ruolo significativo di TGF- β 1 nella patogenesi valvolare, ulteriori studi che utilizzano modelli animali sono necessari per fornire maggiori evidenze sulla correlazione tra TGF- β 1 e la fibrosi cardiaca.

Topi KO per SERT hanno mostrato un aumento di accumulo di collagene nei foglietti delle valvole cardiache, rispetto ai controlli¹³⁰ e miofibroblasti

di valvole cardiache umane hanno dimostrato un aumento della produzione di collagene, in seguito a somministrazione di serotonina¹³⁸.

Lo studio dei processi dello sviluppo embrionale delle valvole cardiache in cui è coinvolta la serotonina, può risultare estremamente utile ai fini di una migliore comprensione degli eventi molecolari responsabili delle patologie delle valvole cardiache.

CAPITOLO II: ENDOCARDIOSI MITRALICA

L'endocardiosi mitralica, nota anche come malattia degenerativa mixomatosa della valvola mitralica, fibrosi cronica della valvola mitralica o malattia cronica mitralica, è la patologia cardiaca acquisita più frequente nel cane e colpisce, prevalentemente, i soggetti anziani, con più del 75% dei cani affetti di età superiore ai 16 anni¹³⁹.

È poco frequente in cani di età inferiore a 5 anni, con l'eccezione dei cani di razza Cavalier King Charles Spaniel nei quali l'insufficienza mitralica viene diagnosticata in circa il 10% dei soggetti con età inferiore a 1 anno¹⁴⁰ e aumenta, linearmente, con il progredire dell'età a cominciare dai 5-6 anni di età¹⁴¹⁻¹⁴⁵.

La patologia può interessare tutte le razze, ma la sua prevalenza varia notevolmente.

I cani appartenenti alle razze di piccola e media taglia, come Barboni nani, Bassotti, Cavalier King Charles Spaniel e Chihuahua, sono maggiormente colpiti¹³⁹.

È stato, inoltre, riscontrato che i soggetti maschi sono molto più predisposti a sviluppare la patologia, rispetto alle femmine, anche ad un'età più giovane rispetto a quella dei 10 anni (il che significa che la frequenza di riscontro della patologia ad una data età è maggiore nei pazienti di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile)¹⁴⁶.

Si deve fare un appunto riguardo alla confusione che si può venire a creare sentendo parlare di "prolasso della valvola mitralica": questa descrizione, infatti, non costituisce un sinonimo di endocardiosi mitralica, bensì una conseguenza, molto frequente, della patologia stessa (che peraltro può verificarsi anche in altre condizioni patologiche)¹⁴⁷.

Ugualmente, non si può parlare di endocardiosi mitralica con il termine di "insufficienza mitralica", dato che, anche in questo modo, non si indica il processo patologico alla base del disturbo, ma solo la condizione emodinamica, conseguente alla malattia degenerativa della valvola mitralica^{148, 149}.

L'endocardiosi mitralica è una patologia a progressione lenta, caratterizzata dalla degenerazione dell'apparato valvolare, che esita nella mancata coaptazione dei lembi valvolari e, di conseguenza, nell'insufficienza valvolare^{139, 150, 151}.

Generalmente, la patologia evolve dalla forma lieve alla forma grave nell'arco di diversi anni e non tutti i cani affetti necessitano di terapia cardiologica¹³⁹.

Negli ultimi anni, lo studio dell'endocardiosi mitralica ha portato all'individuazione dei fattori di rischio per l'evoluzione della patologia, questi sono rappresentati dall'età, dal sesso, dalla razza, dalla gravità delle lesioni valvolari, dalla dilatazione dell'atrio sinistro, dalla frequenza cardiaca, dalla presenza di aritmie e dalla comparsa di sincopi¹³⁹.

Un'età superiore a 8 anni al momento della diagnosi, il sesso maschile, alcune razze come il Cavalier King Charles Spaniel e il Bassotto Tedesco, la presenza di dilatazione atriale sinistra, il coinvolgimento di entrambi i lembi valvolari dal processo degenerativo, una frequenza cardiaca di base elevata, la presenza di aritmie quali fibrillazione atriale o tachicardie sopraventricolari e la presenza di sincopi sono stati correlati a tempi di sopravvivenza ridotti¹⁵¹.

2.1 EZIOLOGIA

L'eziologia dell'endocardiosi valvolare mitralica non è stata ancora accertata, anche se si sospetta una predisposizione genetica. Da studi effettuati su famiglie di Cavalier King Charles Spaniel e Bassotti Tedeschi^{150, 152-154}, sembra che la malattia presenti un'ereditarietà poligenica¹³⁹.

L'ipotesi della natura poligenica della malattia è stata formulata per la prima volta da Swenson nel 1996, in base all'osservazione che i Cavalier King Charles Spaniel, con malattia più grave, davano origine ad una prole affetta, in modo molto più frequente, da soffi cardiaci intensi rispetto ad altri cani affetti da una malattia più lieve^{145, 155}.

Il fatto che le stesse alterazioni evidenziate a livello valvolare, nei cani affetti dalla patologia, si riscontrano anche in uomini affetti da patologie del collagene (per esempio da sindrome Marfan, sindrome Ehlers-Danlos e osteogenesi imperfetta) suggerisce che, alla base delle lesioni degenerative, potrebbe esserci un'anomalia del collagene^{140, 156}.

Un'altra ipotesi propone il coinvolgimento delle cellule valvolari interstiziali (VIC), nella patogenesi della patologia.

Le cellule valvolari interstiziali, normalmente, hanno la funzione di regolare il turnover della matrice extracellulare, attraverso la secrezione della stessa e di enzimi catabolici (per esempio metallo-proteinasi di matrice MMP)^{157, 158}, ma in condizioni normali, sono quiescenti e possono attivarsi in seguito ad un danno endoteliale e allo stress¹⁴⁸.

La continua attivazione delle VIC, per l'instaurarsi di un circolo vizioso (danno endoteliale-stress-riparazione), porterebbe ad un'alterazione del metabolismo correlato al processo di glicosilazione nei glicoconiugati, ed in particolare, nell'attività enzimatica coinvolta nella formazione della componente carboidratica (glicano) legata alla porzione proteica.

In definitiva, il rimodellamento della struttura valvolare, porterebbe ad una diminuzione di collagene e alla deposizione di proteoglicani in eccesso nel suo spessore¹⁵⁹.

Uno studio ha messo in evidenza che le VIC, di cani affetti da degenerazione mixomatosa mitralica, subiscono trasformazioni fenotipiche tramutandosi in miofibroblasti o cellule muscolari lisce¹⁶⁰, che correlano fortemente con lo stadio e la progressione della patologia¹⁶¹.

Il ruolo di queste cellule, nel processo degenerativo, non è ancora chiaro ma molti ricercatori ipotizzano che potrebbero agire da attivatori della degenerazione stessa¹⁵⁸.

Un'altra ipotesi vede il coinvolgimento della serotonina nella patogenesi della malattia mitralica. In medicina umana, diverse condizioni che aumentano i livelli circolanti di serotonina sono state correlate con lo sviluppo di lesioni degenerative valvolari^{125, 158}.

In medicina veterinaria è stato dimostrato che i cani, affetti dalla patologia mitralica, presentano concentrazioni elevate di serotonina e l'upregolazione delle sue proteine di segnalazione, fatti che suggeriscono l'esistenza di un'associazione tra il sistema di segnalazione della serotonina e la patogenesi della malattia^{158, 162, 163 164}.

Infine, un'ipotesi coinvolge il fattore di crescita trasformante beta (Transforming growth factor – TGF- β), nella patogenesi della MMVD, per la stretta relazione che esiste tra i sistemi di segnalazione del TGF- β e la serotonina¹⁵⁸.

Infatti, è stato dimostrato che i cani affetti dalla patologia presentano un'elevata espressione delle proteine e del mRNA del TGF- β a livello valvolare rispetto ai soggetti sani^{158, 161, 162, 165}.

Per quanto riguarda, invece, la patogenesi del carattere progressivo della patologia, una teoria che spesso viene proposta, è che si tratti di una risposta ai ripetuti traumi e allo stress meccanico ai quali è sottoposta la valvola^{156, 158}; Secondo questa teoria, uno o più fattori primari (come per esempio anomalie del collagene o altre alterazioni della matrice extracellulare) possono causare un movimento valvolare anomalo, prollasso e di conseguenza rigurgito.

Il prollasso aumenta lo stress meccanico, al quale è sottoposta la valvola, mentre il rigurgito è responsabile delle lesioni traumatiche.

Si pensa che questi ripetuti traumi possano influenzare la sintesi e il rilascio di sostanze vasoattive (come ad esempio l'endotelina), che potrebbero indurre le alterazioni mixomatose^{158, 166}.

2.2 ANATOMIA E ISTOLOGIA DELLA VALVOLA

MITRALE

L'apparato valvolare è costituito dai lembi valvolari, dall'annulus valvolare fibroso, dalle corde tendinee e dai muscoli papillari^{167 168}.

In soggetti normali, i lembi valvolari sono strutture sottili che si inseriscono sull'anello fibroso valvolare e che si collegano ai muscoli papillari del ventricolo sinistro tramite le corde tendinee¹⁶⁹.

Altro nome con il quale ci si può riferire alla valvola è "bicuspide", in funzione del fatto che è composta da due lembi valvolari: si riconoscono un lembo anteriore o "settale" e un lembo posteriore "murale" (c'è comunque da dire che il loro riconoscimento non è così netto come può apparire quello della valvola tricuspide ad un esame macroscopico)¹⁶⁸.

Istologicamente, la valvola normale presenta quattro strati, i quali seguendo una direzione atrio-ventricolare, sono così descrivibili:

- Endocardio atriale;
- Strato spongioso (costituito da una sottile struttura di fibre collagene, fibre elastiche e fibroblasti dispersi in una matrice mucopolisaccaridica);
- Strato fibroso (rappresenta la zona più spessa della struttura valvolare ed è formato da uno strato denso di fibre collagene);
- Endocardio ventricolare¹⁷⁰.

La superficie endocardica atriale dei lembi valvolari appare liscia in tutta la sua interezza, mentre la superficie endocardica ventricolare si presenta liscia in corrispondenza della base e rugosa verso l'apice del lembo.

Le zone ruvide dei lembi fungono da base di attacco per delle strutture anatomiche sottostanti la valvola, ovvero le corde tendinee: queste si dipartono dai muscoli papillari sulla superficie interna del ventricolo e, arborizzandosi nella loro parte distale, vanno a inserirsi in corrispondenza dell'apice rugoso dei lembi valvolari.

Il lembo settale riceve un numero medio di corde superiore a quello murale.

Nel cane il numero delle corde tendinee varia in maniera significativa da soggetto a soggetto, in un range che varia da 48 a 74.

I muscoli papillari sono molto più spessi di quelli presenti nel ventricolo destro, e vengono identificati come craniale (o sub-auricolare) e caudale (o sub-atriale).

Macroscopicamente, in corso di endocardiosi mitralica, l'aspetto valvolare varia secondo lo stadio della patologia.

Nelle prime fasi le alterazioni sono lievi.

Solitamente si osserva l'allungamento delle corde tendinee e dei lembi valvolari e la formazione di piccoli noduli a livello di margine libero. Inizialmente le lesioni nodulari sono più marcate nel punto dove si inseriscono le corde tendinee e causano il prollasso della valvola verso l'atrio.

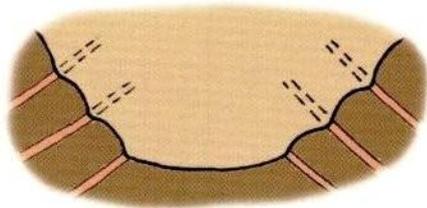
Con la progressione della patologia, questi noduli aumentano di numero e di dimensioni e diventano confluenti.

Nelle fasi più avanzate, il prollasso valvolare peggiora, i margini dei lembi si ispessiscono ulteriormente e le lesioni si sviluppano anche in altri settori dell'apparato valvolare.

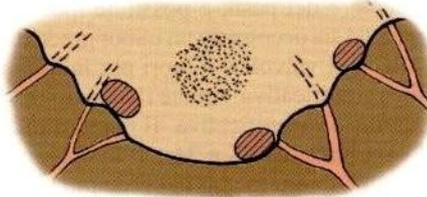
Eventualmente le corde tendinee possono essere coinvolte dal processo patologico ed essere soggette a rottura.

Queste alterazioni causano l'impedimento della coaptazione dei lembi e la valvola diventa incompetente^{139, 169}.

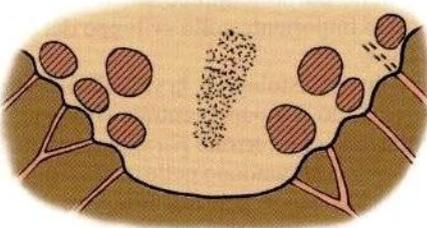
Per la classificazione della progressione delle lesioni valvolari si utilizza lo schema proposto da Whitney e successivamente modificato da Kogure.



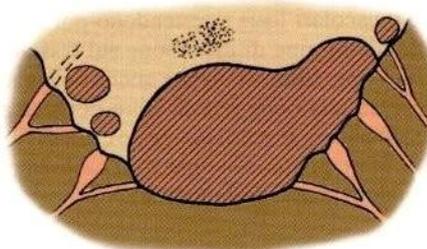
Normale



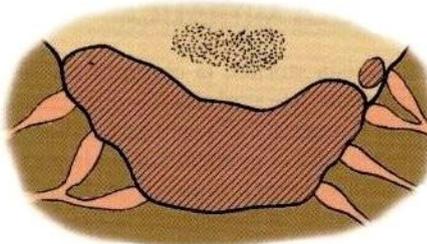
Tipo 1



Tipo 2



Tipo 3



Tipo 4

Da un punto di vista macroscopico, le lesioni valvolari furono classificate per la prima volta da Whitney nel 1970¹⁷¹; secondo questa classificazione, le lesioni associate ad endocardiosi mitralica possono essere di quattro tipi:

- Tipo 1 e Tipo 2: sono lesioni caratterizzate dalla presenza di piccoli ispessimenti nodulari più o meno estesi sui lembi valvolari, senza interessamento delle corde tendinee.
- Tipo 3: comprende la formazione di lesioni più estese sui lembi valvolari associate a valvole ridondanti.
- Tipo 4: le lesioni si estendono alle corde tendinee, e, frequentemente, comportano rottura delle stesse^{148, 172 173, 174}.

Oltre alla degenerazione valvolare e delle corde tendinee, altre modificazioni che si riscontrano in sede anatomo-patologica sono legate alle alterazioni secondarie causate dal rigurgito valvolare quali dilatazione dell'atrio sinistro, dell'annulus valvolare e del ventricolo sinistro (ipertrofia eccentrica), lesioni fibrose endocardiche nell'atrio sinistro

conseguenti all'impatto con il rigurgito (jet lesions) e, nei casi piú gravi, vari gradi di rottura dell'endocardio atriale¹³⁹.

La rottura a tutto spessore della parete atriale provoca emopericardio e tamponamento cardiaco mentre la rottura endomiocardica a tutto spessore può coinvolgere il setto interatriale causando un difetto interatriale acquisito.

Infine, spesso, si evidenziano lesioni aterosclerotiche coronariche alle quali è stata attribuita la disfunzione miocardica, osservata in alcuni casi nel corso della patologia^{140 172}.

Microscopicamente, le prime alterazioni osservate avvengono lungo la superficie atriale della valvola.

L'endotelio prolifera e c'è un aumento del numero di fibroblasti subendoteliali.

Le fibre elastiche tra l'endotelio atriale e la fascia spongiosa si separano. In seguito la spongiosa aumenta marcatamente di spessore mentre la fibrosa subisce processi degenerativi.

Nel corso della malattia, a carico della spongiosa, si evidenzia un marcato aumento della matrice extracellulare, ricca di acido ialuronico e condroitin solfato, in assenza di un significativo aumento delle fibre collagene o elastiche, e si osserva la proliferazione di fibroblasti che conduce alla formazione di piccoli noduli.

Nella fibrosa, i fasci di collagene aumentano di volume, subiscono ialinizzazione e frammentazione e degenerano¹⁴⁰.

Le cellule interstiziali, nelle aree affette, spesso presentano alterazioni morfologiche del nucleo, dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico, disorganizzazione del citoschelettro e mancanza di vescicole secretorie.

Le cellule endoteliali diventano polimorfe e possono mancare in molte aree affette con conseguente esposizione dello stroma extracellulare.

Sono, invece, assenti gli infiltrati infiammatori^{139, 169}.

Alterazioni simili si osservano a carico delle corde tendinee¹⁴⁰.

2.3 FUNZIONE DELLA VALVOLA MITRALE

Fino a non molto tempo addietro, si riteneva che i meccanismi di chiusura ed apertura della valvola mitralica fossero da attribuire alle differenze di pressione fra il compartimento atriale e quello ventricolare durante il normale ciclo cardiaco (diastole-sistole). In altre parole, secondo questo modello la valvola si aprirebbe nel momento in cui la pressione atriale supera quella ventricolare all'inizio della diastole, e si chiuderebbe quando la pressione ventricolare supera quella atriale al momento della sistole.

Oggi tale teoria è stata abbondantemente confutata, non fosse altro per il fatto che se fosse veritiera, per ogni sistole che avviene nel ciclo cardiaco, si verificherebbe un sensibile rigurgito di sangue dal ventricolo all'atrio sinistro prima che i lembi della valvola abbiano il tempo di sigillare l'orifizio atrio-ventricolare.

Il meccanismo di chiusura della valvola mitralica appare dunque come un meccanismo molto più complesso, che richiede quindi un ottimo funzionamento e integrazione dei vari elementi coinvolti nel processo¹⁶⁸.

Tali elementi sono stati identificati in:

- Cambiamenti di flusso trans mitralico;
- Movimenti dell'anulus mitralico;
- Funzione ventricolare sinistra;
- Movimenti di corde tendinee e muscoli papillari;
- Correnti di Eddy;
- Controllo nervoso-muscolare a livello mitralico.

Il cambiamento di flusso transitorio è in un certo senso la base della vecchia teoria, dato che prevede l'azione del gradiente pressorio atrio-ventricolare come input per far aprire passivamente i lembi mitralici.

Per quanto riguarda l'anulus mitralico, la morfologia può dunque essere determinante per la normale attività della valvola, e quindi, un'aterazione a questo livello, ne può compromettere la funzione.

Oltre alla questione prettamente anatomica però, c'è da considerare anche che l'anulus non è statico durante i movimenti di flusso trans

valvolare: infatti, esso compie dei movimenti per garantire una chiusura ottimale dell'orifizio atrio-ventricolare.

Durante la sistole, l'anulus si muove verso l'apice cardiaco, e in questo modo, senza alterare l'equilibrio pressorio delle camere cardiache, favorisce il riempimento dell'atrio sinistro; in fase diastolica invece, l'anulus si muove nella direzione opposta, cioè verso la base del cuore, così da permettere al sangue che a fine sistole si trova in atrio sinistro, di trovarsi in ventricolo sinistro, facilitando il riempimento diastolico ventricolare.

I movimenti dell'anulus sono garantiti dalla funzione contrattile ventricolare; in soggetti con funzione sistolica depressa o compromessa la struttura mitralica ne risente, dato che il contraccolpo elastico della muscolatura ventricolare è diminuito.

In questo senso quindi la funzione ventricolare è molto importante per il normale funzionamento della valvola.

I muscoli papillari e le corde tendinee svolgono una azione combinata nel mantenere le estremità dei lembi valvolari sempre alla stessa distanza rispetto all'apice valvolare.

I muscoli papillari si contraggono su due piani: in un primo momento si ha una contrazione sul piano longitudinale, subito dopo la contrazione procede sul piano trasversale.

Tale contrazione consente ai lembi di acquisire una posizione favorevole alla chiusura all'inizio della sistole.

L'azione fondamentale dei muscoli papillari è dimostrata dal fatto che quando si ha un rimodellamento ventricolare (quale ad esempio un'ipertrofia), questi muscoli vengono spostati in posizione più trasversale, con conseguente alterata trazione delle corde tendinee sui lembi valvolari.

Sono definite "correnti di Eddy" i movimenti, in senso circolare, del sangue che si dirige dalla superficie atriale verso quella ventricolare dei lembi valvolari.

E' stato osservato che queste correnti coadiuvano i lembi mitralici a raggiungere la posizione ottimale per la chiusura all'inizio della sistole.

Infine, ancora oggetto di studio, è il ruolo svolto dalla presenza di una fitta serie di terminazioni nervose e fibre muscolari a livello della valvola mitralica, che a quanto visto finora, giocherebbero un ruolo importante nell'autoregolazione del movimento valvolare stesso¹⁷⁵.

2.4 FISIOPATOLOGIA

La chiusura della valvola è un processo passivo che avviene in protosistole.

Quando la pressione ventricolare sinistra supera la pressione atriale, i lembi della valvola sono forzati in giustapposizione e l'effetto limitante delle corde tendinee ne impedisce il prollasso nell'atrio sinistro.

La coaptazione dei lembi mitralici, in un soggetto normale, è completa e attraverso l'orifizio valvolare non si verifica alcun rigurgito, se non di lieve entità¹⁶⁹.

Perché la chiusura della valvola mitrale sia completa, è necessaria l'integrità anatomica e funzionale dell'apparato valvolare¹³⁹ che può diventare insufficiente a causa di alterazioni dei lembi, di dilatazione dell'annulus, di rottura delle corde tendinee e di un'anomala contrazione dei muscoli papillari.

In corso di endocardiosi mitralica più di uno di questi fattori può essere presente¹³⁹.

La valvola mitrale normale assicura che l'intera gittata del ventricolo sinistro sia espulsa attraverso l'aorta mentre la sua chiusura anomala permette a una parte del volume ventricolare di passare, attraverso l'orifizio rigurgitante, nell'atrio¹⁶⁹.

Le conseguenze dell'insufficienza mitralica dipendono dal grado di riduzione della gittata cardiaca, dal volume rigurgitante, dalle dimensioni e dalla compliance dell'atrio sinistro e del letto vascolare polmonare e dalla comparsa di tachiaritmie¹³⁹.

Un rigurgito mitralico, di lieve entità, non induce variazioni apparenti agli indici di funzionalità miocardica o dei volumi cardiaci.

La portata è conservata e il piccolo volume rigurgitante è facilmente accolto dall'atrio sinistro.

Con la progressione delle lesioni valvolari, il volume rigurgitante aumenta ma diversi meccanismi compensatori cardiaci e non cardiaci (es. renali, neurormonali e vascolari) contribuiscono al mantenimento della portata cardiaca^{139, 176}.

La riduzione del flusso ematico, che viene immesso nella circolazione sistemica, induce un abbassamento della pressione arteriosa sistemica e una riduzione del flusso ematico renale.

I barocettori rispondono all'abbassamento di pressione attivando il sistema nervoso simpatico che agisce aumentando il ritmo di scarica del nodo del seno, aumentando la contrattilità (attraverso l'attivazione dei recettori β_1 del miocardio) e causando la costrizione delle arteriole sistemiche. L'incremento della frequenza cardiaca e della contrattilità aumenta la portata cardiaca, contribuiscono a migliorare la perfusione tissutale e, in combinazione con la costrizione arteriolare, ad aumentare la pressione ematica.

L'attivazione del sistema simpatico rappresenta un meccanismo compensatorio precoce che viene attivato dall'organismo e permette, in un primo momento, la normalizzazione delle alterazioni emodinamiche¹⁴⁰. Tuttavia, i recettori β_1 vanno rapidamente incontro a down-regulation e precocemente gran parte di loro non è più in grado di essere stimolata.

Di conseguenza, la portata cardiaca subisce un'ulteriore riduzione e a questo punto l'organismo deve mettere in atto altri sistemi nel tentativo di aumentarla e riportarla a livelli normali.

L'ipertrofia eccentrica del ventricolo sinistro è il meccanismo compensatorio principale.

La riduzione della gittata e della pressione ematica stimola i reni a produrre ormoni e aumentare la ritenzione di acqua e sodio.

L'aumento del volume ematico, e di conseguenza del ritorno venoso al cuore, causa l'incremento di dimensioni del ventricolo sinistro e del volume telediastolico (precarico)¹⁴⁰.

Solitamente, la contrattilità miocardica, in corso di endocardiosi mitralica, è conservata e il volume telesistolico del ventricolo sinistro rimane nei limiti di normalità permettendo di mantenere la gittata cardiaca a livelli normali. Nel frattempo, l'atrio sinistro aumenta di dimensioni (va incontro a ipertrofia eccentrica) per accogliere il sangue rigurgitante.

In questo modo si evita l'aumento della pressione atriale che si ripercuoterebbe sui vasi venosi polmonari e darebbe origine a edema polmonare.

Con la progressione della patologia, il ventricolo raggiunge i suoi livelli massimi di distensione mentre i meccanismi di ritenzione di acqua e sodio, attuati dall'organismo, persistono.

Di conseguenza, la pressione diastolica ventricolare aumenta e il sangue viene forzato in una camera che non riesce più a dilatarsi.

Questo innalzamento della pressione si ripercuote sull'atrio sinistro che subisce, quindi, l'incremento della sua pressione diastolica mentre il passaggio del sangue rigurgitante nell'atrio durante la sistole, provoca anche l'aumento della pressione sistolica.

L'innalzamento delle pressioni atriali si ripercuote sui capillari polmonari con conseguente trasudazione di liquido nel tessuto polmonare e la formazione di edema¹⁴⁰.

Gli effetti del volume rigurgitante, a livello di pressione atriale sinistra e capillare polmonare, dipendono dalle dimensioni dell'atrio sinistro e della compliance delle pareti atriali.

La compliance atriale è determinata dalla velocità con la quale aumenta il volume rigurgitante, la quale è condizionata dalla velocità di progressione della patologia mitralica, e dal rimodellamento atriale come risposta al sovraccarico di volume.

Nel caso di progressione lenta dell'endocardiosi, si ha spesso l'ingrandimento graduale dell'atrio sinistro che evita l'innalzamento acuto e grave della pressione nei capillari polmonari.

In questi casi, la congestione venosa e l'edema polmonare si sviluppano più tardivamente nel corso della patologia.

In caso, invece, di aumento acuto del volume rigurgitante, come per esempio a causa della rottura di una corda tendinea, l'atrio sinistro subisce un grave aumento della pressione che si ripercuote sui capillari polmonari e causa la formazione di edema acuto¹³⁹.

Nonostante la contrattilità sia conservata nelle prime fasi della patologia, a causa del sovraccarico cronico di volume e del fatto che l'ipertrofia è un rimodellamento patologico, la funzione sistolica si riduce progressivamente e, inesorabilmente, anche in pazienti clinicamente compensati¹³⁹.

Infine, casi avanzati di endocardiosi mitralica possono essere complicati da situazioni che sono correlati all'aumento della pressione e delle dimensioni dell'atrio sinistro.

La rottura dell'atrio può causare tamponamento cardiaco acuto; la presenza di insufficienza tricuspide e/o ipertensione arteriosa polmonare possono condurre a insufficienza cardiaca destra; e, infine, le alterazioni miocardiche possono dare origine a tachiaritmie¹³⁹.

2.5 SINTOMATOLOGIA ED ESAME CLINICO

Molti cani, affetti da malattia degenerativa mitralica, rimangono asintomatici per lunghi periodi di tempo e, in questi casi, il soffio cardiaco è un reperto accidentale.

I soggetti, che invece vanno incontro a insufficienza cardiaca secondaria ad endocardiosi mitralica, presentano i segni clinici di insufficienza congestizia sinistra come intolleranza all'esercizio fisico, tosse, dispnea e sincope.

La tosse è un sintomo comune ed è causata dalla compressione del bronco principale di sinistra dall'atrio dilatato, dall'edema polmonare o più spesso ad una combinazione di queste due condizioni.

La tosse, legata alla compressione del bronco, viene descritta come forte e secca e diventa più evidente nelle ore notturne e in seguito ad esercizio fisico o agitazione ed è definita tosse "cardiogenica", diversa da quella di origine non cardiogenica.

Nella maggior parte dei casi, in ambito clinico il sospetto di endocardiosi mitralica è fornito al momento dell'auscultazione cardiaca¹⁷⁷.

Soprattutto a livello dell'apice cardiaco sinistro, è spesso possibile percepire, in questi pazienti, (a seconda del grado di degenerazione) un soffio sistolico; a volte, se la degenerazione è molto spinta, il soffio diviene udibile anche auscultando l'emitorace destro; caso limite è quello in cui si ha sia un soffio mitralico sia un soffio tricuspide, dati dalla degenerazione mixomatosa di entrambi gli apparati valvolari.

Bisogna, comunque, precisare che spesso il soffio non è presente, soprattutto in quei soggetti alle primissime fasi della malattia che non mostrano segni clinici apprezzabili.

Esiste, però, anche una percentuale di soggetti che versano in condizioni di scompenso cardiaco ma in cui, tuttavia, non è possibile udire il soffio.

Il riscontro di questa casistica può essere spiegato dal fatto che, questi pazienti, sono spesso affetti da disturbi di tipo aritmico, quali la fibrillazione atriale; all'auscultazione, quindi, i rumori cardiaci, prodotti da questo tipo di alterazioni, possono mascherare il sottostante soffio¹⁷⁷.

In ultima analisi, esiste anche la possibilità, nei soggetti ai primissimi stadi della malattia, di non sentire il classico soffio, ma un rumore assimilabile a un "click".

Questo "click" è spesso intermittente e la sua origine è attribuita alla tensione delle corde tendinee e dalla decelerazione del flusso sanguigno contro i lembi mitralici, ridondanti, nell'atrio sinistro.

Un modo per rendere maggiormente udibile questo rumore patologico è indurre nel cane un aumento della frequenza cardiaca; infatti, l'aumento delle contrazioni cardiache è correlato ad un peggioramento del prolasso valvolare, e in definitiva aumenta la probabilità di generare il "click".

L'auscultazione polmonare risulta normale, in pazienti che non presentano segni clinici di insufficienza cardiaca.

In corso di edema polmonare, si sviluppano crepitii e rumori respiratori aspri, inizialmente, meglio udibili a fine inspirazione.

Con la progressione del quadro di edema, i rumori polmonari aumentano di intensità e diventano udibili durante tutta la durata dell'inspirazione e l'espiazione^{139 178}.

2.6 STRUMENTI DIAGNOSTICI

La radiografia toracica rappresenta uno degli esami diagnostici più utili.

Permette di evidenziare l'ingrandimento atriale e ventricolare sinistro, la congestione delle vene polmonari e la presenza di edema polmonare.

In casi di insufficienza mitralica avanzata, la presenza di versamento pleurico, ingrandimento della vena cava caudale, ascite, epatomegalia e splenomegalia accompagnano l'insufficienza cardiaca destra¹³⁹, riscontri elettrocardiografici sono spesso aspecifici.

Il prolungamento dell'onda P (Pmitrale) e del complesso QRS possono accompagnare l'ingrandimento atriale e ventricolare sinistro.

I battiti prematuri sopraventricolari, episodi di tachicardia sopraventricolare, la fibrillazione atriale e i battiti prematuri ventricolari sono alcune delle aritmie che possono essere riscontrate in pazienti affetti da patologia degenerativa mitralica¹³⁹.

L'ecocardiografia è l'esame di elezione per la valutazione della morfologia valvolare e, attraverso l'utilizzo di diversi parametri quantitativi e semiquantitativi, permette la stadiazione della patologia.

Lo studio bidimensionale (B-mode) e monodimensionale (M-mode) sono utilizzati per definire la morfologia e il tipo di lesione, la presenza di prolasso valvolare o di corde tendinee rotte¹⁷⁹ mentre, attraverso la misurazione delle dimensioni e dei parametri funzionali delle camere cardiache, si definisce sia la cronicità della patologia che il grado di rimodellamento.

Nella realtà clinica, la stima dell'endocardiosi mitralica e dei suoi effetti secondari deve essere sempre valutata e confermata da almeno due scansioni ecocardiografiche.

In linea di massima, la presenza di una dilatazione atriale sinistra e l'ipertrofia eccentrica ventricolare sinistra indicano la presenza di un significativo rigurgito mitralico¹⁸⁰.

A tal proposito, un'altra misurazione ecocardiografica che sta assumendo un ruolo sempre più importante nello stimare il grado di endocardiosi mitralica è il "rapporto atrio sinistro-aorta" (LA/Ao).

Il rapporto LA/Ao consente di confrontare il diametro atriale (che in numerose patologie può aumentare) col diametro dell'*anulus* aortico (che è invece relativamente stabile).

Il riscontro di ingrandimento atriale sinistro, tramite questa misurazione, è stato recentemente associato ad un aumento del rischio di mortalità o di progressione della malattia.

Fisiologicamente, tale rapporto (secondo la razza e della taglia del cane) deve essere contenuto in un intervallo che va da 1,0 a 1,2-1,3.

Secondo uno studio recente, un rapporto LA/Ao superiore a 1,4 in soggetti asintomatici è stato associato ad un aumento pari a 2,6 volte del rischio di morte per cause cardiache, mentre un rapporto superiore a 1,7 è associato ad un aumento del rischio di mortalità in un gruppo di cani affetti da endocardiosi mitralica preclinica e con scompenso cardiaco.

Il Color Doppler, associato all'ecocardiografia generale è uno strumento ulteriore per identificare rapidamente la presenza di rigurgito e, attraverso la valutazione dell'estensione del jet rigurgitante nella camera atriale, della larghezza del jet a livello dell'orifizio rigurgitante e dell'area di convergenza del flusso, si può avere una stima accurata del volume rigurgitante.

Il Doppler, a onda continua e pulsata, determina la gravità emodinamica dell'insufficienza attraverso la valutazione della velocità e del profilo dei flussi^{181 179}.

2.7 TRATTAMENTO

Allo stato attuale, non esiste una terapia farmacologica in grado di prevenire o rallentare la degenerazione valvolare e il trattamento chirurgico, per la correzione o la sostituzione della valvola, in campo veterinario, solitamente non è fattibile per motivi tecnici, economici ed etici^{139, 182}.

La gestione farmacologica della malattia mitralica ha lo scopo di migliorare la qualità della vita, controllando i segni clinici e prolungando i tempi di sopravvivenza^{139, 182}.

L'impiego di una terapia cardiologica, in pazienti asintomatici affetti da endocardiosi mitralica, rimane controverso.

Studi in campo umano hanno ipotizzato che, il trattamento precoce con ACE inibitori, sia in grado di rallentare l'insorgenza dell'insufficienza cardiaca¹⁵⁸ (SOLVD study).

In campo veterinario, per lo stesso motivo, i farmaci ACE-inibitori sono stati utilizzati, in passato, come terapia cardioprotettiva in pazienti asintomatici affetti da patologia mitralica lieve, in modo da posticipare o prevenire la comparsa dell'insufficienza cardiaca congestizia.

Tuttavia, i risultati dei vari studi prospettici in medicina veterinaria (SVEP, VETPROOF) non hanno fornito risultati statisticamente significativi che dimostrino che l'impiego di un ACE-inibitore in monoterapia sia in grado di influenzare il momento di insorgenza dei segni congestizi^{169, 183, 184}.

Solo uno studio retrospettivo ha ipotizzato che gli ACE-inibitori potrebbero avere un effetto benefico, sia in termini di ridotto rischio di morte che di prolungamento del periodo asintomatico^{158, 185}.

Nei pazienti con segni clinici attribuibili a insufficienza congestizia, lo scopo della terapia farmacologica è quello di ridurre la pressione venosa e i segni di congestione, mantenere una portata cardiaca adeguata, in modo da prevenire i segni clinici quali debolezza, letargia e facile affaticabilità, ridurre il volume rigurgitante e proteggere il cuore dagli effetti negativi a lungo termine dell'attivazione neuroormonale.

A questo scopo, la terapia è prescritta a misura di paziente e spesso richiede l'utilizzo di più di un farmaco.

Si usano farmaci diuretici, vasodilatatori, inotropi positivi e ACE-inibitori¹³⁹
169, 182 .

CAPITOLO III: *BIOMARCATORI CARDIACI*

NELL'ENDOCARDIOSI MITRALICA

3.1 TROPONINA

In un articolo pubblicato sul Journal Vet Internal Medicine del 2010¹⁸⁶, è stato condotto uno studio per rilevare, eventuali, associazioni tra le concentrazioni di troponina cardiaca I (cTnI) e gravità dell'endocardiosi (MMVD).

Nel predetto articolo la seconda variante, presa in esame, è stata la concentrazione di proteina C-reattiva (CRP).

I risultati, di quest'ultimo parametro, verranno tralasciati per focalizzarci su quelli della cTnI.

Obiettivo dello studio, è stato quello di verificare se le concentrazioni plasmatiche di cTnI e CRP sono associate con la gravità della MMVD e investigare su eventuali legami tra vari parametri specifici, di ogni cane, e le concentrazioni di cTnI e CRP.

I cani sono stati classificati secondo la gravità dell'endocardiosi.

La concentrazione della cTnI plasmatica è stata analizzata tramite Access Systems AccuTnI Assay.

La metodica utilizzata per il dosaggio della troponina I cardiaca, è stata la stessa utilizzata in campo umano, ossia l'Immunodosaggio in chemiluminescenza con particelle paramagnetiche.

Gli anticorpi monoclonali usati nella ricerca della cTnI nell'uomo, infatti, non sono specie - specifici.

Il test ACCESS ACCU TnITM è un dosaggio immunoenzimatico a doppio sito ("sandwich").

Ad una cuvetta di reazione è stato aggiunto il campione di plasma, insieme al coniugato anticorpi monoclonali anti - cTnI - fosfatasi alcalina e particelle paramagnetiche, rivestite di anticorpi monoclonali anti - cTnI.

La cTnI del campione si lega agli anticorpi anti - cTnI sulla fase solida, mentre, il coniugato anticorpi anti - cTnI - fosfatasi alcalina, reagisce con siti antigenici diversi sulle molecole di cTnI.

Dopo l'incubazione nella cuvetta di reazione, la separazione, in un campo paramagnetico ed il lavaggio, hanno rimosso i materiali non legati alla fase solida.

Un substrato chemiluminescente è stato aggiunto alla cuvetta e la luce, generata dalla reazione, è stata misurata con un luminometro.

La produzione di luce è direttamente proporzionale alla concentrazione di cTnI, presente nel campione.

La quantità di analita, nel campione, è stata determinata mediante una curva di calibrazione, a più punti, memorizzata nel sistema¹⁹.

Il limite di rivelazione di questo saggio è stato < 0,01 µg/L.

In questa indagine sono stati reclutati 81 cani di proprietà, con MMVD di grado variabile.

La MMVD è caratterizzata da una progressiva degenerazione della valvola mitrale.

In seguito ai successivi step della malattia, si può arrivare ad un processo di rimodellamento cardiaco che è multimeccanicistico e complesso, con modifiche della massa ventricolare, composizione, volume, che possono influire negativamente sulla performance cardiaca globale¹⁸⁷.

Questi processi possono stimolare il rilascio di biomarcatori cardiaci.

Il danno miocardico provoca un rilascio di troponina in circolo, e se la velocità di rilascio supera il tasso di sintesi, il miocardio potrebbe diventare parzialmente impoverito di troponina, influenzando, quindi, negativamente sulla funzione contrattile¹⁸⁸.

L'età e il sesso possono influenzare le concentrazioni di cTnI^{18, 189, 190}.

I cani, inclusi in questo studio, avevano un'endocardiosi conclamata, mentre il gruppo di controllo, costituito da soggetti sani, erano privi di qualsiasi patologia cardiaca, esclusa tramite accertamento fisico o ecocardiografia.

Cani con cardiopatia congenita, altre malattie cardiovascolari acquisite o malattie d'organo o sistemiche, sono stati esclusi dallo studio.

Inoltre, i cani inclusi, dovevano avere un peso corporeo minore di 15 kg.

E' stato, quindi, creato un database per ciascun cane, in base ad una serie di informazioni ottenute tramite: colloquio con il proprietario, esame fisico, misurazione della pressione sanguigna, registrazione ECG, prelievo di sangue e un esame ecocardiografico.

Il sangue è stato raccolto tramite prelievo di sangue venoso dalla vena giugulare e introdotto in provette da 5 mL contenenti EDTA.

Il plasma, separato per centrifugazione entro 30 minuti dalla raccolta, è stato trasferito in cryotubi di plastica fino a 1,5 mL.

Tutti i campioni sono stati conservati a -80°C per l'analisi successiva.

Il plasma è stato scongelato, lentamente, a temperatura ambiente.

I pazienti sono stati classificati nelle varie fasce della MMVD tramite esame ecocardiografico ed è stato valutato, sempre con la stessa indagine, anche il rigurgito mitralico, rapporto atrio sinistro -aorta (LA/Ao) ecc.

La stima della gravità della MMVD veniva basata sul rapporto LA/Ao e sulle dimensioni del rigurgito mitralico.

I cani sono stati classificati, quindi, come segue:

- sani ($\text{LA} / \text{Ao} < 1.5$ e nessun MR);
- grado MMVD lieve ($\text{LA} / \text{Ao} \leq 1.5$ e $\text{MR} < 30\%$);
- grado MMVD moderato ($\text{LA} / \text{Ao} < 1.8$ e $\text{MR} < 50\%$);
- grado MMVD grave ($\text{LA} / \text{Ao} \geq 1.8$ e $\text{MR} > 50\%$).

Table 1. Dog characteristics, HR, SAP, echocardiographic data, cTnI, and CRP concentrations.

Group	Healthy	Mild	Moderate	Severe
Number	11	39	13	18
Sex (female/male)	10/1	25/14	7/6	6/12
CKCS (yes/no)	8/3	34/5	12/1	14/4
Age (years)	4.5 (3.7-7.5) ^a	7.7 (6.2-10) ^a	10 (8.1-11) ^b	11 (9.1-12) ^b
Weight (kg)	8.8 (8.2-10) ^a	9.2 (8.1-11) ^a	11 (8.8-12) ^a	11 (9.3-13) ^a
HR (bpm)	121 (112-155) ^a	107 (98-131) ^a	135 (96-140) ^a	144 (122-165) ^b
SAP (mmHg)	134 (123-151) ^a	137 (126-150) ^a	149 (136-153) ^a	131 (118-142) ^a
LA/Ao IVSd _{max} (%)	1.2 (1.1-1.2) ^a	1.2 (1.2-1.3) ^a	1.6 (1.5-1.7) ^a	2.0 (1.9-2.4) ^a
LVIDd _{max} (%)	-10 (-15 to -5.9) ^a	-2.8 (-12 to -4.0) ^a	-5.6 (-8.9 to -0.3) ^a	-3.6 (-12 to 4.3) ^a
LVIDs _{max} (%)	-3.8 (-11 to 4.6) ^a	5.1 (0-13) ^a	27 (19-40) ^a	48 (33-64) ^a
LVPWd _{max} (%)	-2.3 (-7.8 to -2.0) ^a	0.8 (-7.8 to -5.8) ^a	-2.2 (-6.1 to 1.3) ^a	-2.1 (-11 to 2.4) ^a
IVSs _{max} (%)	-9.7 (-14 to -0.05) ^a	-0.6 (-8.3 to -5.7) ^a	6.7 (-2.4 to 15) ^a	16 (4-21) ^a
LVIDs _{min} (%)	4.0 (-2.5 to 6.9) ^a	5.9 (1.9-16) ^a	13 (3.6-32) ^a	28 (7.4-47) ^a
LVPWs _{max} (%)	-14 (-20 to -9.1) ^a	-5.6 (-9.0 to -2.0) ^a	1 (-1.1 to 12) ^a	13 (4-19) ^a
h/R	0.5 (0.4-0.5) ^a	0.4 (0.4-0.5) ^a	0.4 (0.3-0.4) ^a	0.3 (0.3-0.3) ^a
FS (%)	29 (27-34) ^a	32 (29-38) ^a	41 (33-45) ^a	44 (40-47) ^a
cTnI concentration (ng/mL)	0.001 (0.001-0.004) ^a	0.003 (0.001-0.024) ^a	0.014 (0.008-0.029) ^b	0.043 (0.031-0.087) ^b
CRP concentration (µg/mL)	0.90 (0.60-1.8) ^a	0.95 (0.48-1.5) ^a	0.90 (0.4-1.4) ^a	1.3 (0.7-3.5) ^a

Fig.3.1.1

Prendendo in considerazione i cani inclusi, si è osservato che, concentrazioni rilevabili di cTnI sono state trovate in 54 cani (67%).

E' stata trovata, tra i 4 gruppi, una differenza significativa (P <.0001) in base alle concentrazioni di cTnI.

Concentrazioni significativamente più alte di cTnI sono state rinvenute nei cani con moderata (P = ,0011) e grave (P <.0001) MMVD, rispetto alle concentrazioni presenti nei cani sani.

Inoltre, i cani con grave MMVD presentavano concentrazioni significativamente più elevate di cTnI dei cani con lieve (P<.0001) e moderata (P=0,0019) MMVD (Figura 3.1.2).

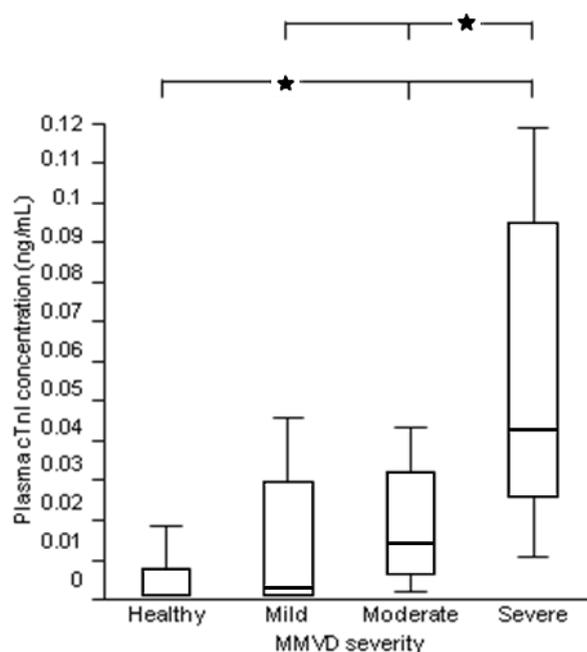


Figura 3.1.2

Nella figura 3.1.2, la parte superiore, la parte inferiore, e la linea nel centro del riquadro rappresentano rispettivamente il 75%, il 25%, e la mediana. Il trattino in basso indica il 10% e la parte superiore il 90%.

Si nota che, le concentrazioni di cTnI aumentano con l'aumentare della gravità della MMVD, ciò indica un danno dei miociti in corso, in un processo di rimodellamento cronico.

Tuttavia, l'età era una variabile che ha influito, maggiormente, sulle concentrazioni di cTnI; quindi, alcune caratteristiche dei pazienti devono essere considerate nella valutazione della cTnI.

Questo risultato è coerente con precedenti studi sui cani^{189, 191}, poiché l'emivita della cTnI è <70 minuti¹⁹², l'aumento delle concentrazioni di cTnI nella nostra popolazione di cani, sono, molto probabilmente, dovute ad un rilascio continuo di cTnI causato da un processo continuo di rimodellamento, piuttosto che da un evento acuto.

Le concentrazioni della cTnI plasmatica nei cani sani nello studio, ha mostrato delle concentrazioni appena rilevabili, o concentrazioni al di sotto della soglia di rilevamento per il dosaggio utilizzato; questo risultato è però in accordo con studi precedenti nei cani sani e nell'uomo^{19, 193, 194}.

Il ritrovamento di quantità anche minime di cTnI deve essere motivato dal fatto che, una parte della troponina risiede dentro il pool citosolico, ed è rappresentata da circa il 2-4% del totale della cTnI¹⁹⁵.

Questa piccolissima quantità può essere, comunque, rilasciata senza evidenza istologica di lesione miocardica¹⁹⁶, quindi, questo potrebbe spiegare come, alcuni pazienti, inclusi nel gruppo di controllo, presentavano concentrazioni basse di cTnI.

La forte associazione tra i valori di cTnI e l'età, indicano come, quest'ultima, provochi cambiamenti del miocardio che portano alla perdita di cTnI.

All'interno del gruppo dei soggetti con MMVD media, che comprendeva quasi il 50% dei cani nella popolazione in studio, l'età era fortemente associata con l'aumento della concentrazione di cTnI.

Nello studio, da me citato, però, vi era una mancata correlazione significativa tra età e concentrazione di cTnI all'interno nel gruppo dei

sana, ciò, potrebbe essere dato dal numero molto ridotto rispetto alla popolazione in esame, nonché da limitate fasce di età; in un precedente studio con un gruppo di 176 cani sani, l'età era stata associata con concentrazioni di cTnI diverse¹⁸⁹, perché i cani anziani sono più a rischio di eventi come l'arteriosclerosi, la cui relazione è stata confermata da diversi autori¹⁹⁷⁻¹⁹⁹.

In uno studio pilota di Linklater risultò che, la cTnI era significativamente aumentata nel 40% dei cani con CHF causata da una sottostante MMVD, cani con valori della troponina (> 0,1 ng/mL) avevano un tempo significativamente più breve di sopravvivenza globale rispetto ai cani con concentrazioni non rilevabili di troponina cardiaca, suggerendo un valore prognostico di cTnI in cani con MMVD²⁰⁰.

Una combinazione della troponina con altri biomarcatori, come il peptide natriuretico di tipo B, avrebbe avuto il potenziale di migliorare ulteriormente tale valore prognostico²⁰¹.

Un limite di questo studio era la mancanza di una valutazione istopatologica del muscolo cardiaco in base al danno miocardico.

Tuttavia, degli studi sperimentali hanno dimostrato un buon accordo tra l'entità del danno miocardico, valutata tramite istopatologia, e le concentrazioni della troponina cardiaca¹⁸.

Quindi, alla vista dei precedenti risultati, si può affermare che, conoscendo la concentrazione di cTnI, aumenta il potenziale di conoscenza del rimodellamento cardiaco globale che si verifica nei cani con MMVD.

3.2 TROPONINA E BNP

Per capire l'importanza dell'utilizzo di più marcatori cardiaci, in pazienti affetti da malattia degenerativa della valvola mitrale, si cita un articolo di Hezzell²⁰² del 2012, in cui viene combinato il potenziale prognostico della troponina cardiaca I ad alta sensibilità (hscTnI) e il frammento N-Terminale peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) in cani con endocardiosi.

Lo scopo di questo studio era quello di trovare un modo per identificare i pazienti, che avevano un rischio maggiore di peggioramento rapido della patologia.

Questo risultato avrebbe rappresentato un beneficio nella clinica, sia per la prognosi, sia per la terapia nei cani con questa malattia in progressione. Nei cani con MMVD è stato dimostrato, in precedenza, che il diametro telediastolico del ventricolo sinistro, normalizzato per il peso corporeo (LVEDDN), e il siero N-terminale di tipo pro-B peptide natriuretico (NT-proBNP) sono indipendentemente predittivi di sopravvivenza²⁰³.

Nei pazienti umani, le strategie che prevedono l'utilizzo di più biomarcatori per la stratificazione del rischio in malattie cardiache, hanno mostrato essere più efficace rispetto all'uso di un singolo biomarker²⁰⁴.

Per stratificazione del rischio, in questo caso, si intende un processo, in base al quale, si valuta il rischio reale che una persona corre per esempio di sopravvivere o morire per quella patologia.

E', quindi, probabile che, misurazioni di più biomarcatori, saranno superiori nello stimare la prognosi in medicina veterinaria.

L'articolo di Hezzell riprende, in parte, i risultati dello studio prima citato di Ljungvall e colleghi, nel quale avevamo visto che cani, con MMVD moderata e grave, avevano concentrazioni, significativamente, maggiori di cTnI rispetto agli animali di controllo sani, e cani con MMVD grave, avevano concentrazioni superiori rispetto ai cani con affezioni lievi e moderate. Perdite croniche di basse quantità di troponine e di cellule miocardiche può essere riflessa da un aumento delle hscTnI e può portare

ad una diminuita capacità contrattile del miocardio, contribuendo all'insufficienza sistolica¹⁸⁶. L'utilità della hscTnI come marcatore prognostico, non è stata però valutata.

Nei pazienti umani, incrementi di hscTnI sono associati ad una diminuzione dei tempi di sopravvivenza, anche per concentrazioni <99% per la normale popolazione.

Si ipotizza, quindi, nello studio, che all'aumentare del danno miocardico, e, quindi, della concentrazione circolante di hscTnI, si abbasserebbero i tempi di sopravvivenza nei cani con MMVD.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la sopravvivenza dei cani con MMVD al fine di individuare indicatori prognostici.

Sono state valutate: le caratteristiche cliniche, il trattamento con eventuali farmaci cardiaci, misurazioni ecocardiografiche e marcatori circolanti.

Si è voluto indagare se la hscTnI può essere associata, realmente, con la sopravvivenza nei cani con MMVD e, inoltre, se la valutazione di entrambi i biomarcatori hscTnI e NT-proBNP ha una potenziale superiorità predittiva rispetto ad un marcatore solo.

Si cercava di puntare a stabilire se la misurazione dei valori di hscTnI sierica e NT-proBNP nel tempo, avrebbe potuto addirittura discriminare tra cause di morte non cardiache e cardiache nei cani con MMVD.

Vengono inseriti nello studio 202 cani con endocardiosi conclamata e 30 controlli sani di età diversa.

I cani sono stati inclusi dopo il rilevamento, da parte di medici veterinari, di un soffio associato a rigurgito mitralico, in qualsiasi fase della storia clinica. Il protocollo, seguito per l'inclusione o l'escusione dei cani al gruppo di studio, è quasi sovrapponibile allo studio precedente, stessa cosa dicasi per le indagini eseguite prima del triage.

Dopo il prelievo di sangue, la troponina è stata misurata con Access System AccuTnI Assay, mentre il NT-proBNP è stato analizzato con VETSIGN Canine Cardiopet Nt-proBNP, IDEXX.

La valutazione della funzionalità e della morfologia della valvola mitralica è stata eseguita tramite ecocardiografia e i cani sono stati esaminati, ad intervalli di 6 mesi, sempre allo stesso modo, fino a quando:

- sono morti,
- sono stati soppressi,
- sono stati persi durante il follow-up,
- hanno raggiunto la fine del periodo di studio.

La diagnosi di MMVD era stata fatta sulla base delle caratteristiche anormali della valvola mitralica (ispessimento, prolasso, o entrambi), presenza di rigurgito, rilevato tramite eco-Doppler, rapporto atrio sinistro-aorta (LA/Ao), diametro telesistolico ventricolare sinistro (LVESD), diametro telediastolico del ventricolo sinistro (LVEDD), e spessore della parete libera del ventricolo sinistro in diastole (LVFWd), LVESD e LVEDD sono stati normalizzati per il peso corporeo.

Lo studio ha avuto una durata di circa 6 anni.

Le analisi statistiche sono state eseguite da un software dell'IDEXX.

Un valore di $P < 0,05$ è stato considerato significativo.

Ai valori di hscTnI, sotto il limite di rilevazione del test (0,01 ng/mL), sono stati assegnati valori di 0,01 ng/mL; invece ai valori di NT-proBNP, al di sotto del limite minimo (50 pmol/L) o al di sopra del limite massimo (3000 pmol/L), sono stati assegnati, rispettivamente, i valori di 50 pmol/L e 3000 pmol/L.

Dai risultati dell'analisi di sopravvivenza è emerso che, 99 cani sono morti o sono stati sottoposti ad eutanasia durante il periodo di studio, 43 dei quali a causa della loro patologia cardiaca, 17 cani sono stati persi, durante il follow-up, e 86 cani sono rimasti in vita alla fine del periodo di studio.

Nel complesso, il tempo medio di follow-up è stato di 407 giorni.

Il valore del cut-off per la hscTnI, selezionato per l'analisi di sopravvivenza, era 0,025 ng/mL, con una sensibilità dell'82% e una specificità del 43%.

Il cut-off per NT-proBNP selezionato, come fattore predittivo di tutte le cause di mortalità, era 524 pmol/L, con una sensibilità del 69% e una specificità del 55%.

Sono state calcolate le probabilità di sopravvivenza con diverse covariate, diversamente combinate tra loro, per scoprire come ognuna di queste mescolanze abbia influito, più o meno significativamente, sulla sopravvivenza.

In ogni gruppo è stato preso in considerazione il rischio relativo (il quale indica quante volte è più alto il tasso d'incidenza della mortalità nei malati rispetto ai sani) e gli intervalli di confidenza.

Dopo tutti questi risultati, si ottiene una tabella (3.2.1) interessante, che combina valori (bassi-alti) di hscTnI con valori (bassi-alti) di NT-proBNP:

	NT-proBNP		
	Low	High	
hscTnI			
Low	45	21	n = 66
High	47	89	n = 136
	n = 92	n = 110	Total = 202

Tab 3.2.1

I cani sono stati assegnati ad una delle quattro categorie in base ai valori combinati della hscTnI e di NT-proBNP.

Il gruppo "medium" è diviso in 2 sottocategorie, come si evince dalla tabella 3.2.2.

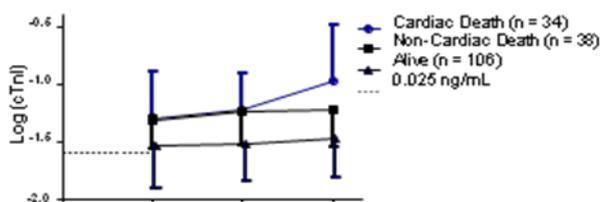
Category	Serum hscTnI (ng/mL) and NT-proBNP (pmol/L)	Median Survival (days) [95% CI for median]	Number of Dogs	Number of Deaths	Hazard Ratio (HR) [95% CI for HR] (relative to low group) (P = .003)
Low	hscTnI < 0.025 and NT-proBNP < 524	1503 [1257.51-1748.5]	45	12 (26.7%)	
Medium	hscTnI < 0.025 and NT-proBNP > 524 OR hscTnI > 0.025 and NT-proBNP < 524	981 [435.8-1526.2]	68	31 (45.6%)	2.83 [1.44-5.55] (P = .003)
High	hscTnI > 0.025 and NT-proBNP > 524	475 [409.7-540.3]	89	56 (62.9%)	5.99 [3.11-11.54] (P < .003)

Tab 3.2.2

Le varie concentrazioni di NT-proBNP e hscTnI sieriche, non essendo normalmente distribuite, furono trasformate logaritmicamente prima della costruzione di nuovi grafici.

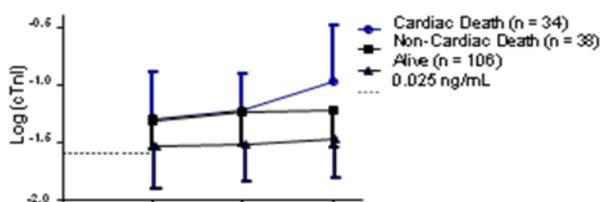
Si dimostrò una significativa interazione tra tempo (mesi) e stato del paziente (vivo, morte cardiaca o morte non cardiaca) in base alle concentrazioni di NT-proBNP sieriche (P = 0,036), e il tasso di incremento di NT-proBNP era significativamente più alto nei cani del gruppo "morte

per cause cardiache” rispetto sia ai pazienti “morti per cause non cardiache” e sia ai soggetti rimasti in vita.



Si può osservare lo stesso risultato nel grafico sottostante.

L'unica variabile a cambiare è il biomarcatore, in questo caso la hscTnI. L'aumento della hscTnI era, significativamente, più alta nei cani deceduti per cause cardiache, rispetto ai deceduti per cause di origine non cardiaca e al gruppo dei sopravvissuti.



HscTnI ha, in precedenza, dimostrato di essere, significativamente, più elevata nei cani con endocardiosi grave rispetto a quelli con la stessa patologia, di grado lieve o moderato, ed era stata prevista una correlazione negativa tra hscTnI e la sopravvivenza.

Questo rapporto non era lineare, infatti nei cani con concentrazioni di hscTnI > 0,025 ng/mL, l'aspettativa di vita era molto più bassa.

Nello studio precedente di Ljungvall¹⁸⁶, il 25% delle misurazioni di hscTnI, nel gruppo dei soggetti con endocardiosi grave, era di 0,031 ng/mL tale che, la maggior parte dei cani, in questa fascia, era stata classificata come ad alto rischio di morte o di essere sottoposta ad eutanasia; lo stesso risultato si ritrova in questo studio.

La differenza con l'articolo precedente, riguarda il 75% delle misurazioni della troponina nei soggetti inclusi nel gruppo “endocardiosi di grado lieve o moderata”, che avevano concentrazioni rispettivamente di 0,024 e 0,029 ng/mL e, nello studio di Hezzell, sarebbero stati inclusi nei soggetti con basso rischio di morte.

Questo risultato non coerente, probabilmente, è dovuto ad una diversa media di età del gruppo preso in esame, a conferma della teoria che un aumento della hscTnI è correlato all'età¹⁸⁶.

Sappiamo anche che, sia nel cane che nell'uomo, le troponine aumentano in una varietà di malattie non cardiache²⁰⁵⁻²⁰⁸ ed è così possibile che alcuni di questi cani, apparentemente sani, avessero delle malattie subcliniche, che avrebbero potuto influire sulle concentrazioni della troponina.

NT-proBNP è un marker di aumentato stress della parete cardiaca.

Anche se la sua concentrazione aumenta con la gravità della MMVD, ed è complementare con la hscTnI. NT-proBNP non è stato associato in modo indipendente con il tempo di sopravvivenza nel modello multivariato con cause diverse di morte.

Data la frequenza, con cui viene diagnosticata la MMVD, e le difficoltà tecniche legate all'ottenimento di misurazioni ecocardiografiche affidabili, i biomarcatori circolanti possono essere un'arma in più per il clinico.

Quando le variabili ecocardiografiche sono state escluse dal modello multivariato, sia NT-proBNP e hscTnI, sono risultate predittive di sopravvivenza, a sostegno di questa affermazione.

Ciò implica che i due marcatori forniscono informazioni complementari e differenti sul paziente.

Tuttavia, quando le altre variabili, tra cui l'ecocardiografia, sono note, il valore prognostico del loro utilizzo in coppia diminuisce.

Dall'analisi con più multivariate per la morte di origine cardiaca, NT-proBNP (ma non hscTnI) era associata in modo indipendente con il tempo di sopravvivenza.

LVEDDN, concentrazioni circolanti di hscTnI, frequenza cardiaca, e l'età sono associazioni, indipendentemente con la sopravvivenza (per tutte le cause di mortalità), nei cani con MMVD.

LVEDDN e NT-proBNP sono, indipendentemente, associate con la sopravvivenza (mortalità cardiaca), mentre età e hscTnI sono, indipendentemente, associate alla sopravvivenza (mortalità non cardiaca).

3.3 PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO B

Gli studi condotti sul NT-proBNP in soggetti affetti da endocardiosi mitralica, presenti in letteratura, si possono classificare in due grandi filoni.

I primi hanno come obiettivo quello di confermare o meno la correlazione esistente tra concentrazioni diverse di NT-proBNP e il tasso di sopravvivenza nei cani con MMVD.

Gli altri lavori hanno come obiettivo quello di confermare o meno l'uso di NT-proBNP come biomarker di gravità dell'endocardiosi.

Tra quest'ultimi si possono annoverare gli studi di: Chetboul²⁰⁹, Tarnow⁸⁷, Moesgaard²¹⁰ e MacDonald²¹¹.

Partendo dal primo studio pubblicato, ritroviamo il lavoro di Tarnow. L'autore voleva dimostrare se esisteva una relazione tra NT-proBNP nei Cavalier Kings Charles Spaniels (CKCS) e l'evoluzione della malattia (MMVD).

I soggetti presenti nello studio vennero divisi in 3 gruppi:

- Gruppo 1: soggetti sani (gruppo di controllo);
- Gruppo 2: soggetti con MMVD ma senza segni di insufficienza cardiaca;
- Gruppo 3: soggetti con MMVD e segni clinici di CHF (controlli positivi).

A sua volta il gruppo 2 fu suddiviso in base alla gravità del rigurgito mitralico (MR).

- 2a: nessun o minimo MR;
- 2b: moderato MR (quantità di reflusso $\leq 80\%$);
- 2c: grave MR (quantità di reflusso $\geq 80\%$).

I cani, compresi nel gruppo 2c, avevano un rapporto atrio sinistro/aorta (LA/Ao) e un diametro del ventricolo sinistro a fine diastole (LVEDD), maggiore rispetto al gruppo 2a e 2b.

Dai risultati di questo studio si evinse che, i soggetti appartenenti al gruppo 2c e quelli con segni di CHF, avevano livelli di NT-proBNP più alti rispetto al gruppo di controllo e al gruppo 2a e 2b.

L'NT-proBNP dovrebbe essere elevato prima dell'inizio di una insufficienza cardiaca in cani con rigurgito.

Sebbene fosse stata trovata una relazione tra le misurazioni ecocardiografiche e i livelli di NP nei cani con rigurgito mitralico, i livelli del peptide natriuretico erano validi solo per rilevare i soggetti con elevato rigurgito e non con gradi moderati di MMVD.

Misurazioni delle concentrazioni di NT-proBNP, potrebbero aumentare la probabilità di rilevare soggetti con gravi rigurgiti mitralici prima di sottoporre il cane ad una ecocardiografia, rilevandosi così un'alternativa costo-beneficio ideale.

In un secondo studio di Chetboul²⁰⁹, la popolazione presa in esame è di 94 cani divisa in 2 gruppi: 22 controlli (sani), e 72 soggetti con MMVD, precedentemente esaminati e inclusi dopo aver rilevato la presenza di:

- Soffio apicale sistolico a sinistra;
- Assenza di malattie infettive;
- Ecocardiografia e Doppler con presenza di ispessimento valvolare e rigurgito mitralico.

I 72 cani con MMVD vennero, successivamente, divisi in 2 gruppi in base alla presenza o meno di ingrandimento cardiaco e, a loro volta, ulteriormente suddivisi in altri 2 sottogruppi, in base alla presenza di un rigurgito mitralico minore o maggiore del 30%.

Dopo 12 mesi dal primo controllo, i suddetti pazienti vennero ricontrollati e classificati in soggetti stabili (S), se erano ancora asintomatici e in scompensati (D), se erano morti o presentavano in quel momento segni di CHF.

Dai primi risultati si evinse che, nei cani appartenenti al gruppo dei soggetti con MMVD, vi era una relazione tra la concentrazione di NT-proBNP e la gravità del rigurgito, che era stato precedentemente evidenziato all'eco-Doppler.

Nei cani con MMVD e con un rigurgito minore del 30 %, le concentrazioni del peptide erano molto simili a quelle dei controlli.

Al contrario nei soggetti con MMVD e rigurgito maggiore del 30%, le concentrazioni di NT-proBNP erano molto più alte rispetto a tutti gli altri gruppi presenti nello studio.

Dopo 12 mesi, come detto, i soggetti vennero divisi in stabili e scompensati.

I risultati delle concentrazioni di NT-proBNP dimostrarono che i cani (D) avevano livelli molto più alti rispetto agli (S).

I risultati clinici dei cani, senza segni di endocardiosi, risultano ancora poco definiti, e i criteri d'identificazione di tali soggetti che, sono comunque ad alto rischio di scompenso, rimane il principale problema della cardiologia veterinaria.

Questo studio cercò di dimostrare l'abilità di NT-proBNP di predire, nell'arco di 12 mesi, l'evoluzione della patologia cardiaca in cani con MMVD asintomatica; naturalmente tale risultato può essere coadiuvato da esami ecocardiografici.

Come già discusso in altri studi, ad esempio in quello di Drouin e colleghi²¹², i cani sani avevano concentrazioni di NT-proBNP più basse rispetto ai cani affetti da endocardiosi mitralica.

La seconda suddivisione dei soggetti in base al rigurgito, più o meno severo, mostrò, a sua volta, un'ulteriore differenza per quanto riguarda le concentrazioni di NT-proBNP, confermando il fatto che tali valori sono associati alla gravità della patologia.

La terza classificazione dimostrò che i soggetti morti o scompensati avevano livelli di NT-proBNP maggiori rispetto agli stabili.

Misurazioni di tale peptide dovrebbero quindi essere usate per integrare le informazioni ottenute tramite altre indagini, come l'ecocardiografia e aiutare nella stratificazione o nel monitoraggio della gravità del rigurgito durante la fase asintomatica dell'endocardiosi.

Nello studio di Moesgaard S.²¹⁰, vennero inclusi 75 soggetti divisi in 5 gruppi:

Gruppo 1: soggetti sani

Gruppo 2: CKCS senza o con minimo rigurgito mitralico (MR)

Gruppo 3: CKCS con medio MR

Gruppo 4: CKCS con moderato o grave MR

Gruppo 5: soggetti con insufficienza cardiaca congestizia (CHF)

I valori ottenuti dalle concentrazioni di NT-proBNP aumentarono, linearmente, passando dal gruppo 1 al gruppo 5, con massima espressione in quest'ultimo.

Comparando tali risultati con i valori ottenuti dalle misurazioni ecocardiografiche, si evince che queste sono significativamente associate con le concentrazioni di NT-proBNP.

Le scoperte confermano che, concentrazioni di NT-proBNP plasmatiche aumentano significativamente nei cani con CHF in seguito ad endocardiosi^{87, 209}; e aumentano in proporzione al peggioramento del rigurgito mitralico.

In questo studio la concentrazione di NT-proBNP era approssimativamente più alta del 60% di quella trovata in studi simili⁸⁷.

Differenze nei range di misurazione, influenzano quindi, qualsiasi paragone con gli altri studi, e si propone di poter sistemare i valori di cut-off per questo studio.

L'altro grande gruppo di studio è quello che ipotizza l'uso di NT-proBNP come indicatore di sopravvivenza.

Il primo lavoro che venne fatto per confermare questa ipotesi, fu quello di MacDonald²¹¹ che, oltre ad affermare come negli altri studi, che la concentrazione del peptide natriuretico era alta nei soggetti con MMVD di grado moderato fino a quelli con grado grave di endocardiosi, cercava di predire in base alle concentrazioni di BNP, la morte dei soggetti in studio.

I soggetti classificati, in base alla gravità della loro endocardiosi, furono riesaminati dopo 4 mesi e, successivamente, dopo 18 mesi dalla prima indagine.

I cani deceduti furono suddivisi in altri 2 gruppi: morti per cause cardiache o no.

Al 4° mese di sopravvivenza, dei 25 soggetti iniziali, ne furono riesaminati solo 20, 9 dei quali erano morti prima dei 4 mesi dal controllo iniziale, per l'aggravamento della patologia.

Fu trovata una relazione dose-risposta tra la concentrazione di NT-proBNP plasmatica e il tasso di mortalità a 4 mesi dalla diagnosi.

La relazione era: per ogni aumento di 10 pg/mL in [BNP] plasmatico, il tasso di mortalità aumenta approssimativamente del 44%.

Nei sopravvissuti al secondo controllo, nei 18 mesi successivi, non venne però trovata una relazione tra la [BNP] e la loro sopravvivenza; si concluse appurando, che un'alta concentrazione del peptide natriuretico potrebbe predire una morte prematura dovuta a patologie cardiovascolari in cani con MMVD sintomatici.

Il limite di questo studio era il numero basso di soggetti esaminati.

Nel 2009 Serres et al, pubblicarono uno studio²¹³ nel quale, per la prima volta, in una grande popolazione di cani si dimostrò che la concentrazione plasmatica di NT-proBNP è correlata con la gravità della MMVD, valutata grazie a diversi indici ecocardiografici e Doppler.

Si dimostrò anche, che la concentrazione plasmatica di NT-proBNP è un buon predittore di morte cardiaca entro i 6 mesi per i cani con MMVD sintomatica, qualunque sia lo stato clinico al momento del test.

Questo risultato fu particolarmente evidente in cani con MMVD di grado severo.

Sapendo che la MMVD è caratterizzata da un'imprevedibile evoluzione, con un periodo sintomatico di durata variabile, da alcuni mesi a più di un anno, secondo studi prospettici²¹⁴⁻²¹⁷, i presenti risultati mostrano, dunque, che NT-proBNP potrebbe essere un aiuto nella valutazione di questa fase sintomatica, fornendo informazioni sia sulla gravità della malattia, sia sulla prognosi.

Tuttavia, in questo studio, NT-proBNP è risultato essere il miglior predittore di morte cardiaca rispetto ad altri indicatori di gravità indiretti di MMVD (variabili eco-Doppler, urea nel plasma e le concentrazioni di creatinina).

La superiorità di NT-proBNP, rispetto ad altri biomarcatori testati, può essere in parte spiegato con il suo "Valore sintetico", che riflette diversi aspetti di complicazioni della MMVD.

Si pensa che questo avvenga perché il BNP, aumentando in risposta allo stiramento ventricolare, può non essere immediatamente rilevato nelle

fasi iniziali della patologia, quindi, rispecchierebbe fasi avanzate della malattia cardiaca quando la dilatazione del ventricolo è già presente.

La concentrazione plasmatica di NT-proBNP, valutato nei cani sintomatici con MMVD, è correlata con la gravità della malattia e, cosa ancora più importante, è un fattore predittivo efficace di esito cardiaco a 6 mesi, indipendentemente e in combinazione con lo stato clinico al momento della presentazione.

Questo marcatore prognostico può rappresentare un valido aiuto per i medici veterinari e può anche aiutarli nella scelta del trattamento e delle sue eventuali modifiche.

Il limite di questo studio era il periodo di follow-up breve.

Nel 2010 Moonarmart e colleghi²⁰³ pubblicarono uno studio con l'obiettivo di determinare se, le concentrazioni del peptide natriuretico, avrebbero potuto predire tutte le cause di mortalità in cani con MMVD sintomatica e non.

Dei 100 pazienti in esame, 30 morirono durante il follow-up.

Erano presenti 2 variabili considerate, indipendentemente, predittive di tutte le cause di mortalità: il diametro del ventricolo sinistro, a fine diastole (LVEDD), e la concentrazione di NT-proBNP.

Un incremento del LVEDD di 0,1 cm, aumentava il rischio di mortalità del 20%, mentre un aumento di 100pmol/mL di NT-proBNP, aumentava il rischio del 7%.

Nel 2008 Borgarelli nel suo studio²¹⁸ aveva associato l'ingrandimento atriale al rischio maggiore di tutte le cause di morte, ma fu proprio con Moonarmart che a questa variabile si aggiunse la [NT-proBNP]²⁰³.

Gli animali dopo i primi esami furono classificati in 2 gruppi:

- Con segni di patologia cardiaca
- Senza segni di patologia cardiaca

Vennero poi ricontrollati, ogni 6 mesi, e i deceduti venivano ulteriormente classificati a seconda della morte per cause cardiache o meno.

Alla fine dello studio si dimostrò che la popolazione di cani con MMVD, con concentrazione di NT-proBNP e LVEDD maggiori, era indipendentemente

e in maniera incrementale, predittive di tutte le cause di mortalità; nei soggetti con valori più alti, questo rischio tendeva ad aumentare e associarsi maggiormente ad una morte per cause cardiache entro 12 mesi. [NT-proBNP], ingrandimento atriale e aumento del LVEDDN apparivano predittivi anche nel sottogruppo che non presentava segni clinici.

In questa popolazione, circa la metà dei soggetti, era morta a causa della patologia cardiaca; il numero relativamente basso conferma le precedenti osservazioni che i soggetti con MMVD peggiorano lentamente.

L'abilità di identificare anche soggetti asintomatici, rilancia il ruolo dei biomarcatori.

L'ultimo studio, preso in esame, pubblicato nel 2012 è di Wolf e colleghi²¹⁹, diversamente dagli altri studi fatti in precedenza, si cercò di investigare se, misurazioni seriali di NP, avrebbero potuto aggiungere ulteriori informazioni al quadro clinico già presente.

Lo scopo del lavoro era quello di confermare o meno l'abilità del NP, di predire la sopravvivenza in cani con CHF dovuta all'endocardiosi.

All'inizio dello studio tutti e 26 i soggetti, furono valutati per i loro livelli di NP e classificati in una classe da A a D, a seconda della gravità della CHF. Vennero poi ricontrollati a distanza di 7 e 30 giorni e, successivamente, ogni 3 mesi se ancora vivi.

A 12 mesi dal primo controllo, i soggetti vennero classificati in 2 gruppi, a seconda se erano vivi o morti, con l'intenzione di calcolare un cut-off per i peptidi natriuretici e confrontare i risultati delle due popolazioni a 12 mesi. I cani, con concentrazioni di NT-proBNP minori di 3047 pmol/mL al giorno 1, non sopravvivevano più a lungo dei cani con valori maggiori al precedente.

Invece, i cani che al follow-up presentavano livelli < a 965 pmol/mL, rimasero in vita più a lungo di pazienti con livelli >965 pmol/mL.

Secondo gli autori, questo studio a differenza degli altri, è il primo in cui si paragona l'abilità di NT-proBNP a 2 diversi periodi di controllo.

Il presente studio dimostra che, una [NT-proBNP] < di 965 pmol/mL a 7 e 30 giorni dal trattamento iniziale per CHF, è associato a risultati migliori.

Mentre al giorno 1 tali livelli non ci davano alcuna informazione utile, riguardo la sopravvivenza dei pazienti.

Normalmente, la decisione di cambiare la terapia in pazienti con insufficienza cardiaca si basa sulla valutazione dei sintomi, esami del sangue e sulle radiografie. Lo studio di Wolf suggeriva che, i livelli di NT-proBNP potevano essere usati con successo per guidare il trattamento dei pazienti con CHF, definendo una certa soglia, a cui i livelli sarebbero dovuti diminuire in corso di terapia²¹⁹.

I limiti di questo studio sono la popolazione ristretta di cani, e le date dei follow-up non standardizzate.

3.4 SEROTONINA NELLA MMVD

La malattia degenerativa della valvola mitrale (MMVD) è comune nei cani ed è un'importante causa di morbilità e mortalità nell'uomo²²⁰ e nei cani¹⁷¹. In quest'ultimi la MMVD rappresenta dal 40 al 75% di tutte le patologie cardiache^{177, 221}.

Si sa relativamente poco riguardo ai meccanismi molecolari che sono alla base della fisiopatologia del disturbo.

La patobiologia della MMVD è simile sia nell'uomo che negli animali^{222,156}. Cambamenti patologici nella MMVD includono la trasformazione fenotipica delle cellule interstiziali^{157, 161}, deposizione esuberante di proteoglicani (PG) / glicosamminoglicani (GAG)²²³, e la degradazione della rete di matrice fibrillare, caratterizzata da una disorganizzazione del gruppo collagene e dalla frammentazione delle fibre elastiche¹⁵⁷.

Tutti questi cambiamenti patologici portano all'indebolimento dell'apparato valvolare cardiaco e conducono alle manifestazioni funzionali riferibili con il rigurgito mitralico.

Sono state identificate specifiche proteine effettrici, che già si pensava avessero un ruolo importante nei cambiamenti patologici nella degenerazione delle valvole mitraliche, tra cui: i proteoglicani, le collagenasi di matrice, l'elastina, le actine del muscolo liscio note come α -SMA etc.

In modelli animali, la serotonina esogena o il blocco della clearance della serotonina stessa, sono associati allo sviluppo di una degenerazione simil mixomatosa.

Rispetto alla MMVD canina, incrementi di traslazione e di trascrizione dei componenti di segnale della serotonina inclusi i recettori 5HT, protein-chinasi attivatori di mitogeno e relativi componenti come il fattore di crescita trasformante TGF- β , suggeriscono un ruolo chiave della serotonina, nella fisiopatologia della MMVD^{162, 165, 224, 225}.

Gli studi effettuati in medicina veterinaria suggeriscono un coinvolgimento del TGF- β nella patogenesi dell'endocardiosi valvolare mitralica.

Si pensa che il TGF- β intervenga nella trasformazione patologica delle cellule interstiziali valvolari²²⁶.

Le cellule interstiziali valvolari rappresentano il tipo cellulare prevalente nella valvola e presentano caratteristiche intermedie tra quelle dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce.

Si pensa che siano coinvolte nell'inizio e nella progressione della patologia mitralica¹⁶² e diversi studi suggeriscono che una loro alterazione sia necessaria perchè si sviluppi la degenerazione valvolare.

Nell'uomo e nei modelli animali, molti dei cambiamenti istologici e molecolari, sono simili a quelli osservati nei cani con MMVD²²⁷. In entrambi i soggetti, i sistemi cardiovascolari sono ricchi di recettori per la serotonina, e l'espressione dei recettori 5HT è aumentata nei soggetti con MMVD.

Tra i primi studi, condotti sulla serotonina e pazienti affetti da endocardiosi, si deve annoverare lo studio di Arndt e colleghi²²⁸ che, nella sua popolazione di cani incluse 120 soggetti, di cui 36 fecero parte del gruppo di controllo, 50 erano affetti da MMVD e i restanti 34 erano dei Cavalier King Charles Spaniels, razza molto predisposta all'endocardiosi.

L'obiettivo di questo studio era quello di misurare le concentrazioni sieriche di serotonina nei cani con MMVD, in quelli di razza predisposti alla patologia e in cani di grossa taglia sani.

I risultati indicarono che, i cani con MMVD avevano concentrazioni di serotonina sierica molto più alte dei cani predisposti all'endocardiosi e dei controlli sani.

I pazienti malati, a questo punto, vennero riclassificati in base alla razza: Cavalier King o no, e in questi due gruppi, non vi erano differenze sostanziali di concentrazioni di serotonina.

Invece, paragonando i Cavalier non affetti e le altre razze, i livelli di serotonina nei Cavalier erano più alti.

I limiti di questo studio erano le varie influenze alimentari e farmacologiche che potevano modificare i livelli di serotonina e che non erano state prese in considerazione.

Nello studio di Lacerda²²⁹ si esaminava l'ipotesi che, uno sforzo alla trazione delle valvole cardiache poteva determinare l'espressione di determinate proteine, inducendo la patologia mixomatosa.

Si cercò di scoprire se, questo iniziale stiramento, potesse indurre la sintesi del precursore della serotonina, la sua successiva sintesi e la concomitante liberazione di markers condrogenetici.

Lo studio venne effettuato su valvole cardiache ottenute postmortem da cani senza apparenti segni di patologie cardiovascolari.

Le valvole vennero prelevate immediatamente dopo la morte, fissate in formalina, montate in paraffina, sezionate, colorate e osservate al microscopio, prima e dopo aver fatto una cultura valvolare.

Prima di tutto questo, le valvole erano state sottoposte ad una forza di tensione ciclica del 30% e paragonate con altre valvole che non avevano subito nessuna forza di tensione per 72 ore.

Furono, quindi, determinate, non solo tutte le proteine implicate in questo meccanismo, con tecnica immunoblotting, ma venne anche misurata la serotonina attraverso test ELISA.

Tralasciando i risultati delle varie proteine e soffermandoci, invece, sulla serotonina, si notò che nelle valvole che avevano subito una tensione del 30%, le concentrazioni di serotonina e del suo precursore (5-idrossitriptofano) erano molto più alte di quelle che non avevano subito nessun stiramento.

Anche in medicina umana era stato riportato l'aumento di questo neurotrasmettitore nei soggetti affetti da MMVD; basandosi su queste evidenze, Lacerda et al. ipotizzarono che la sintesi locale di serotonina gioca un ruolo chiave nella patologia e che la stimolazione iniziale induce l'espressione dell'idrosillasi del triptofano e, quindi, della successiva sintesi della serotonina.

Questi risultati supportano una possibile relazione funzionale tra la patogenesi della valvulopatia "serotoninergica" e la MMVD.

In questi studi furono trovati dei limiti perché, la tensione che si sottoponeva alle valvole era di tipo acuto, invece è stato dimostrato che, nell'endocardiosi, le forze che portano alla degenerazione sono di tipo

croniche; inoltre il gruppo di controllo in questo articolo (0% forze di trazione), non poteva essere considerato come un controllo fisiologico.

Da uno studio condotto nel 2013, Ljuingvall e colleghi²³⁰ dimostrarono che, concentrazione di serotonina sierica è associata alla gravità della MMVD.

La popolazione in studio era formata da 120 cani divisi in sani e affetti da MMDV; a sua volta questi ultimi furono divisi in base al rapporto LA/Ao e alla quantità di rigurgito mitralico (MR) in:

- Senza o minimo MR
- Grado medio (LA/Ao ≤ 1.5 e MR $< 30\%$)
- Grado moderato (LA/Ao > 1.5 e < 1.8 e MR $< 50\%$)
- Grado grave (LA/Ao ≥ 1.8 e MR $> 50\%$).

La concentrazione di serotonina diminuiva all'aumentare della gravità della MMVD e il rapporto LA/Ao era la variabile più fortemente associata con la 5-HT.

Inoltre, CKCS che sono predisposti ad un inizio precoce di MMVD, avevano alte concentrazioni di 5-HT sierica, rispetto ai cani di altre razze, e i soggetti di sesso femminile avevano valori di 5-HT più alti rispetto ai maschi.

La concentrazione di serotonina sierica diminuisce all'aumentare della gravità della malattia, ciò potrebbe suggerire che, se la 5-HT gioca un ruolo nella degenerazione valvolare, lo fa principalmente nei primi stadi della malattia.

Inoltre, CKCS che sono i più predisposti all'endocardiosi, hanno valori di serotonina più alti rispetto ai cani di altre razze.

Si ipotizzò che, alterazioni nel sistema di segnalamento per la serotonina, anche se non può essere considerata l'unica causa della patologia, potrebbe essere coinvolta nel processo patologico di degenerazione valvolare.

I limiti di questo studio devono essere attribuiti alla conservazione dei campioni a -80° prima delle analisi e dall'interferenza che ha avuto la macrotrombocitosi su un sottogruppo di pazienti.

L'ultimo studio sulla serotonina, risale al 2014 ed è di Mangklabruks²³¹, nel quale viene fatto un confronto tra le concentrazioni di serotonina

plasmatica e piastrinica in soggetti sani, in cani con MMVD e in cani predisposti all'endocardiosi.

Bisogna ricordare che in condizioni fisiologiche, la serotonina circolante è maggiormente immagazzinata nelle piastrine e i livelli plasmatici di serotonina sono mantenuti molto bassi dai meccanismi di assorbimento delle piastrine e dalla normale clearance²³².

Le piastrine rilasciano la serotonina in circolo quando si verifica l'attivazione e l'adesione delle piastrine.

Quindi, la concentrazione di serotonina sierica riflette il rilascio di 5-HT dalle piastrine dopo il prelievo di sangue e non riflette assolutamente la quantità di serotonina plasmatica in circolo.

I cani erano stati classificati prima in 2 gruppi: sani e malati; poi a loro volta, questi ultimi, erano stati suddivisi in base alla classificazione ACVIM in: B e C.

Quindi, sono state calcolate le concentrazioni di serotonina plasmatiche e piastriniche.

I risultati hanno dimostrato che non vi era una significativa differenza tra le concentrazioni di serotonina dei soggetti sani e quelli malati e neppure tra le due sottodivisioni e il gruppo di controllo.

Sappiamo già, che la maggior parte della serotonina rilasciata in circolo, è captata dalle piastrine e solo il 2-5 % si ritrova nel plasma.

Quindi [5-HT] sieriche non riflettono i livelli di serotonina circolante ma piuttosto riflette la quantità di serotonina rilasciata dalle piastrine dopo il prelievo.

Le limitazioni di questo studio sono state: la popolazione ristretta e la possibilità di attivazione piastrinica, durante il prelievo di sangue, che ne avrebbe falsato positivamente il risultato.

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è:

- Determinare le concentrazioni di cTnI, BNP e serotonina in soggetti affetti da endocardiosi mitralica;
- Valutare le concentrazioni sieriche di cTnI in cani con MMVD con due diversi analizzatori: IMMULITE 2000®, metodo a chemiluminescenza e TOSOH, metodo immunoenzimatico e di fare la stessa cosa per le concentrazioni di BNP valutate con TOSOH e con test Cardiopet proBNP®;
- Confermare o smentire se esiste una correlazione tra le due metodiche di laboratorio sia per la cTnI sia per il BNP;
- Determinare se, i tre biomarcatori cardiaci sono correlati tra loro e con il peggioramento dell'endocardiosi mitralica.

CAPITOLO IV: MATERIALI E METODI

ANALISI TROPONINA

TOSOH BIOSCIENCE AIA® 360



Fig 4.1

AFFIDABILITA'

SEMPLICITA' D'USO

- Avvio in meno di 10 minuti
- E' sufficiente inserire i campioni e gli AIA-PACK e premere START

FLESSIBILITA'

- Gestire molti carichi di lavoro ottimizzando i consumi di reagente
- Fino a 25 campioni di pazienti a test AIA-PACK in un solo ciclo
- Possibilità di caricare nel sistema provette primarie e coppette per test
- Possibilità di carico continuo di reagenti
- Utilità nei casi di emergenza

PRINCIPIO DEL METODO

L'AIA-PACK cTnI 2°Gen. è un test immunoenzimometrico a due siti che viene eseguita interamente nell'AIA-PACK. Troponina I presente nel campione è legato con anticorpo monoclonale ed immobilizzata su una fase solida magnetica e nell'AIA-PACK l'enzima viene marcato con anticorpo monoclonale. Le sfere magnetiche vengono lavate per eliminare enzima

non legato all'anticorpo monoclonale marcato e sono poi incubate con un substrato di fluorogenica, 4 metilumbelliferil fosfato (4MUP). La quantità di anticorpo monoclonale marcato con enzima che si lega ai siti è direttamente proporzionale alla concentrazione della troponina I nel campione. Si crea così una curva standard e concentrazioni del campione sconosciuto sono calcolati utilizzando questa curva. AIA-PACK cTnI 2°Gen sostituisce il prodotto originale AIA-PACK cTnI ed è stato etichettato come seconda generazione al fine di evitare ogni possibile confusione.

Tempo di incubazione: 10 minuti

Volume del campione: 50microlitri

Tipo di campione: siero

Range del saggio: sopra i 120 ng/ml

Stabilità della calibrazione: 90 giorni

Sensibilità: 0,02 ng/ml

RANGE DI RIFERIMENTO

Insieme alla clinica, la specificità è pari al 100% con <0,1 ng/mL in un intervallo di valori per i cut-off dell'AMI.

PRECISIONE

La precisione del coefficiente di variazione intra-saggio (durante le corse) è stata valutata in tre campioni di siero e due campioni di plasma replicati per 10 determinazioni in cinque diversi lotti di reagente su AIA-21.

La precisione del coefficiente di variazione inter-saggio (tra le corse) è stata valutata in cinque diverse concentrazioni analizzando campioni di controllo in 20 corse separate su AIA-21.

SENSIBILITA'

La minima concentrazione rilevabile (MDC) di troponina I è stimata in 0,02 ng/mL. Il MDC è definita come la concentrazione di troponina I che corrisponde al tasso di fluorescenza che è due deviazioni standard dal tasso

medio di fluorescenza di 20 determinazioni replicate di un calibratore zero. Questi studi sono stati eseguiti sull'AIA-600 II su diversi lotti di reagenti.

INTERFERENZE

Interferenza è definita, ai fini di questo studio, per recuperare i limiti esterni del 10% della media dei campioni conosciuti.

Emoglobina Aggiunto (fino a 436 mg/dL), bilirubina coniugata (fino a 18,6 mg/dL) e bilirubina libera (fino a 16,5 mg/dL) non interferiscono con il test.

Lipemia, come l'aggiunta di trigliceridi (fino a 2000 mg/dL) non interferisce con il test.

Aggiunta di albumina (fino a 2,5 g/dL) non interferisce con il test.

Acido ascorbico(fino a 20 mg/dL) non interferisce con il test.

Fattore reumatoide (fino a 45 UI/ml) non interferisce con il test.

Eparina (fino a 50 U/ml) non interferisce con il test.

ANALISI BNP

Preparazione del campione

L'emivita del BNP canino è molto breve (circa 90 secondi)²³³ e, sebbene l'NT-proBNP è più stabile, la raccolta del campione, la manipolazione, e i protocolli nel trasporto possono influenzare i risultati.

NT-proBNP del cane può essere misurato sia dal siero che dal plasma, e le concentrazioni ottenute dai 2 tipi di campione, sono generalmente simili²³⁴

80.

Fino a poco tempo fa i campioni dovevano essere raccolti in provette color lavanda (fig 4.2), contenenti acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), centrifugare immediatamente e il plasma doveva essere trasferito in provette rosa fornite dal produttore contenenti un inibitore della proteasi; provette che dovevano essere refrigerate e inviate il giorno stesso al laboratorio.

Attualmente, grazie all'ulteriore sviluppo del Cardiopet® pro-BNP, non è più necessario utilizzare specifiche provette, ma sono sufficienti normali provette da siero contenenti plasma EDTA.



Fig 4.2

Test di misurazione BNP

Per la determinazione del NT-proBNP, l'IDEXX mette a disposizione dei medici veterinari il Cardiopet® proBNP, che accresce la capacità di determinare rapidamente e in modo accurato lo stato cardiovascolare dei pazienti.

Il test Cardiopet® proBNP è un semplice esame ematologico per la misurazione dei livelli in circolo di Nt-proBNP (peptide di tipo B o peptide

natriuretico cerebrale). L'organismo possiede numerosi meccanismi per eliminare l'ormone attivo al fine di controllarne l'attività. L'eliminazione del BNP avviene molto rapidamente (entro pochi secondi) e risulta quindi difficile misurarne la sua concentrazione. Il test Cardiopet® proBNP misura, invece, l'Nt-proBNP in circolo poiché questa parte risulta meno labile e più facilmente rilevabile.

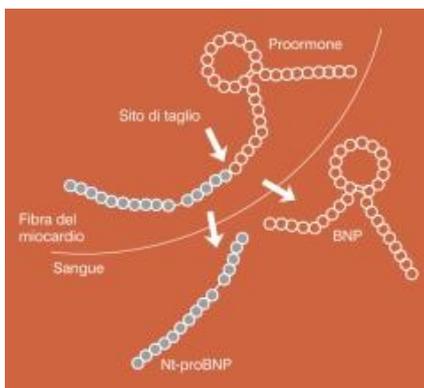


Fig 4.3²³⁵

Cardiopet® proBNP è un parametro biochimico obiettivo, un marker biologico che permette in caso di sospetta cardiomiopatia o insufficienza cardiaca di stilare una diagnosi più accurata. I risultati ottenuti aiutano a valutare la gravità patologia e a migliorare l'approccio al paziente grazie a una diagnosi precoce.

Cardiopet® proBNP è un esame minimamente invasivo e richiede solo un prelievo di sangue.

Valori di riferimento di NT-proBNP sierici e plasmatici in cani sani in 11 diversi studi

Table 3
Comparison of plasma/serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide values in healthy dogs from 11 studies.

Authors	n	Age (year)	Bodyweight (kg)	Breeds	Plasma/serum NT-proBNP (pmol/L)
Cunningham et al. (2012)	17	Mean ± SD 5.8 ± 2.9	Mean ± SD 30.0 ± 6.9	Mixed breed, Doberman Pinscher, Golden Retriever and other breeds	Median [range] 462 [58–1210]
Hazzel et al. (2012)	30	Median (IQR) 9.0 (6–11)	Median (IQR) 11 (7.2–13.8)	Cross-breeds, Cavalier King Charles Spaniel (n = 7), Miniature Poodle, Yorkshire Terrier, Border Collie	Median (IQR) 324 (167–530)
Kalishan et al. (2011)	8	Median (range) 6 (1–9)	Median (range) 28.5 (3.4–55.0)	Great Dane, German shepherd dog, Rottweiler, Doberman Pinscher, Maltese, Bearded Collie, Cocker spaniel.	Median [range] 744 [531–2710]
Weiss et al. (2011)	196	Mean 4.4	Mean 34.4	Doberman Pinscher	Median [range] 303 [22–1325]
Collins et al. (2010)	10	Data not shown	Data not shown	Cavalier King Charles Spaniels, crossbreeds, Boxers, Lurchers, English Springer and Cocker Spaniels, Doberman Pinscher, Bull Terriers, Labrador and Golden Retriever, Great Dane, Irish, Wolfhound, Gordon and Irish Setter, Whippet, Miniature Schnauzer, Fox Terrier	Median [range] 413 [36–487] before freezing 709 [378–825] after freezing
Adkinson et al. (2009)	9	Median 5	Median 19.8	Data not shown	Median [range] 373 [209–738]
Chetoui et al. (2009)	22	Mean ± SD 9.1 ± 1.6	Mean ± SD 6.8 ± 3.6	Small size breeds: King Charles and Cavalier King Charles Spaniel, Bichon, Yorkshire Terrier (n = 12); Other small breeds (n = 10)	Median [range] 278 [68–515]
Kalishan et al. (2009)	28	Median 7	Median 20.4	Mixed breed, Labrador and Golden Retrievers, American Staffordshire Terriers, other breeds	Median [range] Week 1: 377 [159–631] Week 2: 320 [159–632] Week 3: 358 [159–630]
Raffaet al. (2009)	39	Mean 6.0	Data not shown	Unknown	Median [range] 118 [2–673]
Schmidt et al. (2009)	23	Median (IQR) 7 (5–8)	Median (IQR) 17.7 (10–30)	Mixed breed (48%), Golden Retriever, Keeshonds and other breeds	Mean (95% CI) 261 (225–303)
Oyama et al. (2008)	40	Median (IQR) 7.0 (4.3–8.0)	Median (IQR) 19.9 (8.5–30.5)	Mixed breed (40%), Great Dane, Golden retriever and other breeds	Median (IQR) 290 (478–598)

Tab 4.3

ANALISI DELLA SEROTONINA

USO PREVISTO

Saggio immunoenzimatico per la determinazione diagnostica in vitro quantitativa di Serotonina in siero, plasma, piastrine, urina umani. Il test può anche essere usato per scopi di ricerca su tessuti omogenati e colture cellulari supernatanti.

SOMMARIO E SPIEGAZIONI

La serotonina è un prodotto intermedio del metabolismo del triptofano ed è situato principalmente nelle cellule enterocromaffini dell'intestino, nei neuroni serotoninergici del cervello, nelle piastrine e nel sistema nervoso centrale è un neurotrasmettitore consolidato. Nel sangue in circolazione, quasi tutta la serotonina è concentrata nelle piastrine nell'uomo. Concentrazioni alterate di serotonina circolante sono state correlate a severe condizioni patologiche quali mal di testa cronici da tensione, schizofrenia, ipertensione, malattia di Huntington, distrofia muscolare di Duchenne e appendicite acuta in fase precoce. La determinazione dei livelli di serotonina nel siero è importante dal punto di vista clinico per la valutazione diagnostica della sindrome carcinoide. Nel prossimo futuro è prevedibile un interesse crescente nei confronti della determinazione di serotonina nelle piastrine e della sua cinetica di cattura e rilascio.

PRINCIPIO DEL TEST

La preparazione dei campioni (derivatizzazione di serotonina in N-acilserotonina) è parte della diluizione dei campioni ed è ottenuta mediante incubazione dei rispettivi campioni con il Reagente di Acilazione. La procedura del dosaggio ricalca il principio di base dell'ELISA per competizione, con competizione in questo caso di antigeni biotinilati verso antigeni non biotinilati per un numero fisso di siti anticorpali di legame. La quantità di antigene biotinilato legato all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione. Quando il sistema è in equilibrio, l'antigene libero biotinilato viene lavato via e il

complesso antigene biotinitato + anticorpo viene rilevato usando alcalinfosfatasi anti-biotina come marker e p-nitrofenilfosfato come substrato. La quantificazione dei campioni è raggiunta paragonando l'attività enzimatica dei campioni rispetto alla curva preparata usando standard noti.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il kit è spedito e trasportato a temperatura ambiente e deve essere conservato a 2-8°C. Non esporre a luce solare diretta e ad alte temperature. La piastra microtitrata aperta, è stabile fino a scadenza del kit, se conservata nel suo involucro ben chiuso riposta a 2-8°C.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Alcuni cibi contengono dosi sostanziali di serotonina, come anche alcuni farmaci, potrebbero favorire il rilascio del neurotrasmettitore e potrebbero alterare i livelli del campione. I pazienti devono evitare di assumere tali cibi: avocado, banane, caffè, prugne, pomodori, noci e farmaci come: aspirina, MAO inibitori, nicotina, catecolamine.

Siero

Non usare campioni di sangue itterici o lipemici e i campioni torbidi vanno centrifugati per rimuovere il materiale al loro interno. Il campione è stabile a 18-25° per 2 ore, a 2-8° per 6 h e a ≤20° per 6 mesi.

Plasma e piastrine

Più del 98 per cento della serotonina in circolazione è localizzata nelle piastrine ed è rilasciata durante la coagulazione del sangue. Il sangue deve essere raccolto attraverso una puntura venosa in provette di plastica contenenti EDTA o citrato come anticoagulanti (ad es. 10 mL Monovette NC con 1 mL di soluzione citrato della SARSTEDT). I campioni sono mantenuti e centrifugati a temperatura ambiente per 10 minuti a 200 x g per ottenere il plasma ricco di piastrine. (PRP). In seguito il supernatante del PRP è trasferito in un'altra provetta e le piastrine vengono contate.

Per ottenere il pellet di piastrine, un'aliquota di 200 µL di PRP (contenenti da 350000 a 500000 piastrine/ µL) è aggiunta a 800 µL di soluzione fisiologica salina e centrifugata a 4500 x g per 10 minuti a 4°C (o a 10000 x g per 2 minuti a 4°C). Il supernatante viene poi eliminato. 200 µL di acqua doppio destillato è aggiunta al pellet, che ora può essere conservato congelato a < -20°C per diverse settimane senza alterazioni del contenuto di serotonina.

Dopo lo scongelamento dei campioni congelati, centrifugare a 10000 x g per 2 minuti a temperatura ambiente. 20 µL del supernatante sono usati per l'ELISA. Se si vuole misurare la serotonina nel plasma privo di piastrine (PFP), un'aliquota del PRP viene centrifugata a 4500 x g per 10 minuti a 4°C (o a 10000 x g per 2 minuti a 4°C) per ottenere il plasma privo di piastrine (PFP). 50 µL di supernatante vengono usati nell'ELISA per la misurazione della serotonina libera (non legata alle piastrine).

Il plasma deve essere conservato a ≤ -20° ed è stabile per 2 settimane, a ≤ -80° per 12 mesi.

PROCEDURA

10.3.1. Campione A: Siero, Urina, estratto di piastrine, omogenato tissutale e controlli

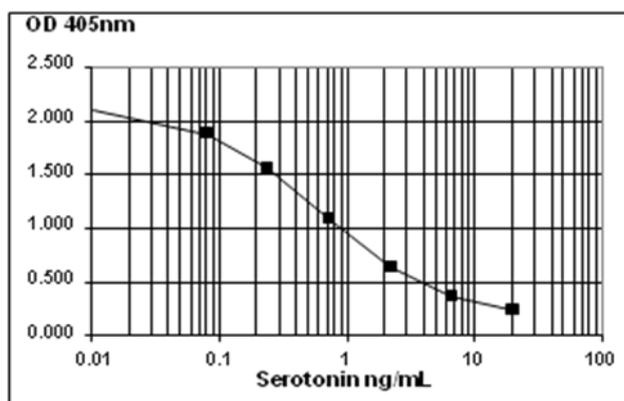
1.	Pipettare 20 µL di ogni Controllo e di ogni campione A in provette di vetro .
2.	Pipettare 100 µL di Soluzione Tampone diluita in ogni provetta. Mescolare sul vortex mixer.
3.	Pipettare 25 µL di Reagente di Acilazione in ogni provetta. Agitare ogni provetta nel vortex immediatamente dopo aver pipettato.
4.	Coprire le provette. Incubare per 15 min a 37°C in bagno di acqua.
5.	Pipettare 2 mL di Soluzione Tampone diluita in ogni provetta. Mescolare sul vortex mixer.
6.	Centrifugare tutte le provette per 10 min a 1500 x g .
	I campioni preparati devono essere analizzati immediatamente. Il supernatante è stabile solo 1 h a 18-25°C.

Campione B: plasma privo di piastrine

1.	Pipettare 50 µL di ogni campione B in provette di vetro .
2.	Pipettare 100 µL di Soluzione Tampone diluita in ogni provetta. Mescolare sul vortex mixer.
3.	Pipettare 25 µL di Reagente di Acilazione in ogni provetta. Agitare ogni provetta nel vortex immediatamente dopo aver pipettato.
4.	Coprire le provette. Incubare per 15 min a 37°C in bagno di acqua.
5.	Pipettare 1 mL di Soluzione Tampone diluita in ogni provetta. Mescolare sul vortex mixer.
6.	Centrifugare tutte le provette per 10 min a 1500 x g .
	I campioni preparati devono essere analizzati immediatamente. Il supernatante è stabile solo 1 h a 18-25°C.

Tipica Curva di Calibrazione

Standard	Serotonina (ng/mL)	DO _{Media}	DO/DO _{max} (%)
A	0.0	2.118	100.0
B	0.08	1.883	88.9
C	0.24	1.568	74.0
D	0.73	1.089	51.5
E	2.2	0.641	30.3
F	6.6	0.369	17.4
G	19.8	0.245	11.6



VALORI ATTESI

I soli risultati non dovrebbero essere l'unica motivazione alla base di una scelta terapeutica. Devono essere correlati ad altre osservazioni cliniche e test diagnostici. Soggetti apparentemente sani mostrano i seguenti valori: (97.5 % percentile) Campioni n Unità Media Interval.

Campioni	n	Unità	Media	Intervallo
Siero	99	ng/mL	88.6	30 – 200
Plasma privo di Piastrine	35	ng/mL	3.7	1.8 – 7.5
Piastrine	35	ng/10 ⁹ Piastrine	490	217 – 861
24 h Urina	49	µg/giorni	83.1	≤ 200

Si consiglia ad ogni laboratorio di calcolare i propri valori di riferimento.

LIMITI DELLA PROCEDURA

La raccolta dei campioni ha influenza significativa sui risultati del test. Azide e thimerosal a concentrazioni > 0.1 % interferiscono con questo test e possono portare a risultati non veritieri. I seguenti componenti del sangue non hanno effetto significativo (+/-20%) sui risultati del test fino ai livelli di concentrazione riportati in tabella:

emoglobina 8,33 mg/mL

bilirubina 0,33 mg/mL.

Questo studio è stato condotto su 91 cani visitati presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa, tra gennaio 2009 e dicembre 2013; tutti erano affetti da MMVD.

Ogni paziente in esame è stato pesato e ne stata valuta l'età.

Ogni soggetto è stato quindi sottoposto ad esame clinico completo, profilo emato-biochimico e urinario, radiografia del torace in posizione latero-laterale (LL) e ventro-dorsale (VD), studio elettrocardiografico (ECG) e valutazione ecocardiografica. I valori ecocardiografici presi in considerazione sono stati: i parametri di funzionalità del ventricolo sinistro come: frazione d'eiezione (Ejection Fraction, EF), frazione d'accorciamento (Shortening Fraction, SF); rapporto tra il diametro dell'atrio sinistro e dell'aorta (Left atrium/Aorta, LA/Ao), volume in telediastole e in telesistole, rispettivamente (End Diastolic Volume Index EDVI e End Systolic Volume Index, ESVI), indicizzati alla superficie corporea e le entità del rigurgito della valvola mitralica e tricuspide.

I pazienti sono stati classificati secondo Consensus Statements of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM), in base ai rilievi clinici e agli indici ottenuti con le indagini strumentali, in classi da B a D.

◆ Stadio A: Cani ad elevato rischio di sviluppo d'insufficienza cardiaca (es. CKCS) ma senza apparenti alterazioni strutturali cardiache al momento dell'esame.

◆ Stadio B: Cani con malattia cardiaca strutturale (es. degenerazione valvolare) e segni clinici associati (soffio cardiaco) ma non hanno mai sviluppato insufficienza cardiaca (asintomatici).

◆ Stadio B1: Cani asintomatici ma senza evidenza radiografica o ecocardiografica di ingrandimento cardiaco (rimodellamento).

◆ Stadio B2: Cani asintomatici con rigurgito valvolare significativo ed evidenza radiografica e/o ecocardiografica d'ingrandimento cardiaco

◆ Stadio C: Cani con malattia valvolare e segni clinici presenti o passati d'insufficienza cardiaca (sintomatici).

◆ Stadio D: Cani con malattia allo stadio terminale (insufficienza cardiaca refrattaria alla terapia standard).

TABELLA	
Parame.	Descrizione
SF	Frazione di accorciamento: esprime la percentuale di riduzione del diametro ventricolare in sistole (il valore ottenuto è abbastanza variabile nelle diverse razze canine, tende a essere più elevato nei cani di razza piccola, mentre nelle razze grandi si possono trovare soggetti normali con frazioni di accorciamento più basse del 35%).
EF	Frazione di eiezione: va interpretato come indicatore della risposta contrattile. Tale valore è influenzato da numerosi fattori, quali il carico diastolico, il carico sistolico, i trattamenti farmacologici e la contrattilità intrinseca.
La/Ao	Rapporto Atrio sx/ Aorta. Consente di confrontare il diametro atriale, in progressivo aumento in numerose cardiopatie, e l' <i>anulus</i> aortico, che è invece relativamente stabile. I valori di riferimento per la normalità sono inferiori a 1,4 secondo la taglia dell'animale.
LVIDd	Diametro diastolico ventricolo sinistro.
EDVI	Indice di volume telediastolico espresso in mL/m ² (calcolo eseguito con la formula di Teicholz). Indipendentemente dalla taglia, i valori di riferimento per la normalità sono compresi fra 80 e 100 mL/m ² .
LVIDs	Diametro sistolico ventricolo sinistro.
ESVI	Indice di volume telesistolico espresso in mL/m ² (calcolo eseguito con la formula di Teicholz). Indipendentemente dalla taglia, il valore di riferimento per la normalità deve essere uguale o inferiore a 30 mL/m ² .
BSA	"Body surface area". E' un indicatore migliore del peso corporeo. Serve per mettere in relazione le misure del cuore con altezza e peso del soggetto. In ecocardiografia attraverso il BSA viene calcolato l'indice cardiologico.

Tab 4.4

Ad ogni soggetto, inoltre, è stato prelevato un campione ematico di cui una parte è stata utilizzata per effettuare il profilo emato-biochimico e un'altra, divisa in due aliquote è stata conservata a -20°C: un'aliquota è stata inviata al laboratorio di analisi San Marco (Padova, Italia) dove è stato effettuato il dosaggio della Troponina I cardiaca mediante Chem (Chemiluminescence, IMMULITE 2000®) l'altra è stata analizzata presso il Laboratorio del Dipartimento di Scienze Veterinarie mediante FEIA-TB (Fluorescence Enzyme Immuno Assay-Tosoh Biosciences).

La metodica Chem prevede un dosaggio immunometrico in chemiluminescenza amplificata, il range di riferimento del test è tra 0,05 – 0,24 ng/ml. La metodica FEIA-TB prevede un dosaggio immunoenzimatico e il suo il range di riferimento per la troponina è tra 0,0 – 0,09 ng/ml.

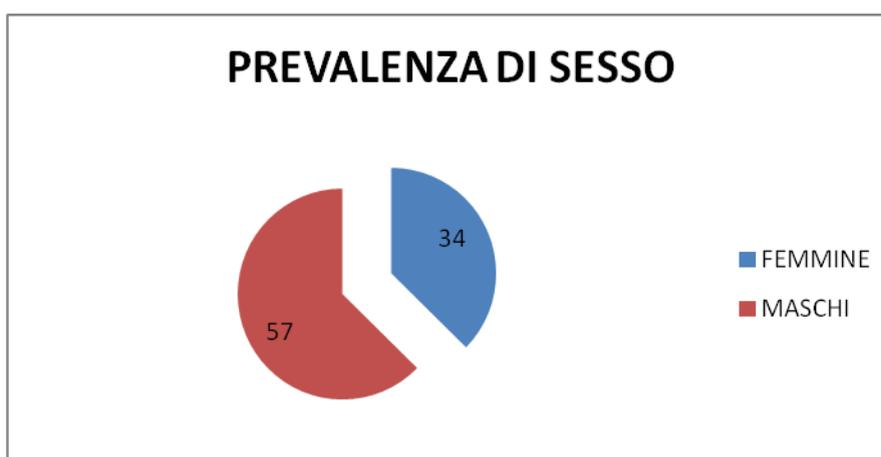
I dati ottenuti sono stati analizzati con un software commerciale (MedCalc® Statistical Software version 13.1.0 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2014).

Ad 8 dei 91 soggetti in esame, sono state valutate anche le concentrazioni di BNP presso il Laboratorio del Dipartimento di Scienze Veterinarie mediante Cardiopet® NT-proBNP (IDEXX) e con strumentazione Tosoh e per finire su 20 soggetti è stata valutata la serotonina tramite test ELISA.

CAPITOLO V: RISULTATI



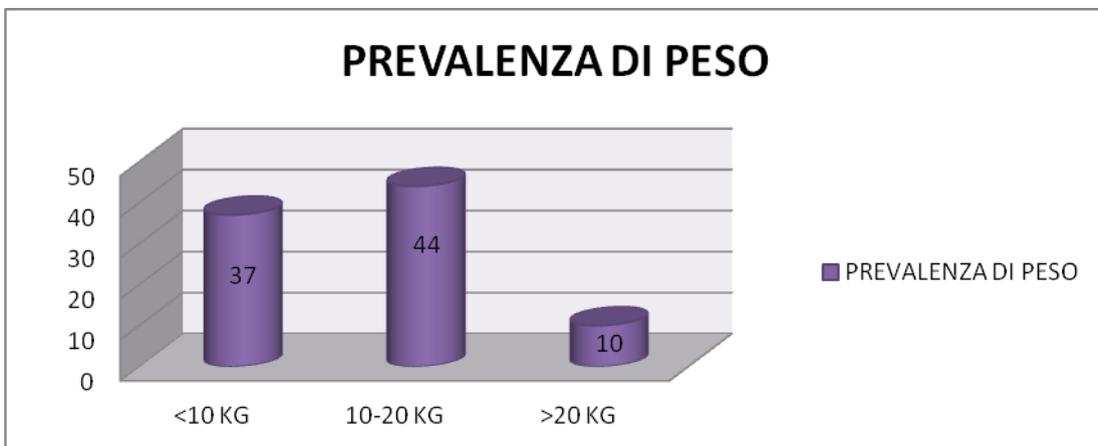
Il gruppo dei malati era formato 91 soggetti di cui: 28 Meticci, 12 Cavalier King Charles Spaniel (CKCS), 10 Barboni, 9 Yorkshire Terrier, 8 Setter Inglesi, 6 Espaniel Breton, 5 Pinscher, 3 Chihuahua, 2 Pechinesi, 8 cani di altre razze. Il gruppo dei cani con MMVD era composto da animali di piccola-media taglia.



Il nostro gruppo di studio era formato da 34 femmine e 57 maschi (62%) affetti da MMVD.



Classificando i soggetti in base all'età, 38 avevano un'età ≤ 10 anni e 53 ≥ 10 anni con un'età media di 11,6.



Classificando i cani in base al peso, trentasette soggetti avevano un peso ≤ 10 kg, quarantaquattro tra 10 e 20 kg e dieci ≥ 20 kg, con un peso medio di 13,3 kg.

MEDIA \pm DEVIATION STANDARD								
ACVIM	EF	FS	LA/Ao	EDVI	ESVI	LVIDd	LVIDs	BSA
B	70,05 ± 10	40,46 $\pm 7,67$	1,5 $\pm 0,2$	74 ± 17	27 $\pm 10,56$	3,1 $\pm 0,88$	2,1 $\pm 0,7$	0,6 $\pm 0,33$
C	70,94 ± 12	41,94 $\pm 9,2$	2 $\pm 0,4$	122 ± 23	47 $\pm 23,15$	3,7 $\pm 0,9$	2,4 $\pm 0,7$	0,4 $\pm 0,23$
D	74,10 ± 16	44,90 ± 11	2,1 $\pm 0,2$	133 ± 25	42 $\pm 19,70$	3,2 $\pm 0,5$	2 $\pm 0,6$	0,3 $\pm 0,16$

Analizzando la sede e l'intensità dei soffi cardiaci, 43 soggetti su 91 (47%) affetti da patologia cardiaca, hanno mostrato solo un soffio a carico della valvola mitrale. La velocità massima di rigurgito nei 48 soggetti con soffio sistolico su entrambe le valvole atrio-ventricolari è risultato maggiore a carico della mitrale.

I parametri di funzionalità del ventricolo sinistro, frazione d'eiezione (EF) e frazione d'accorciamento (SF), sono risultati aumentati in 52 soggetti (57%) e diminuiti in 26 soggetti (28%), il sovraccarico di volume (EDVI > 80ml/m²) si è verificato in 53 cani; di questi 31 hanno mostrato anche un deficit sistolico (ESVI > 30ml/m²). Il rapporto atrio sinistro aorta (LA/Ao) era aumentato in tutti i soggetti in grado diverso in base al gruppo ACVIM di appartenenza.

In base ai rilievi clinici e strumentali, il grado d'insufficienza cardiaca dei pazienti è stato classificato secondo ACVIM Consensus Statement: 61 cani in classe B, 19 in classe C e 11 in classe D.

TROPONINA

ACVIM	FEIA-TB (MEDIA±DS)	Chem (MEDIA±DS)
B	0,14±0,43	0,47±1,67
C	0,29±0,43	0,93±1,49
D	0,33±0,32	0,96±0,94

Tab 5.2

ACVIM	CANI	FEIAT-TB>RR	Chem>RR	r	r ²	Rho
B	61	12	13	0,99	0,99	0,72
C	19	14	16	0,99	0,98	0,97
D	11	9	10	0,95	0,80	0,93

Tab 5.3

Tab.5.3: Confronto tra cTnI Chem vs.cTnI FEIA-TB in cani con MMVD divisi secondo ACVIM Consensus Statement.

Chem (Chemiluminescence, IMMULITE 2000[®]), FEIA-TB (Fluorescence Enzyme Immuno Assay-Tosoh Biosciences).

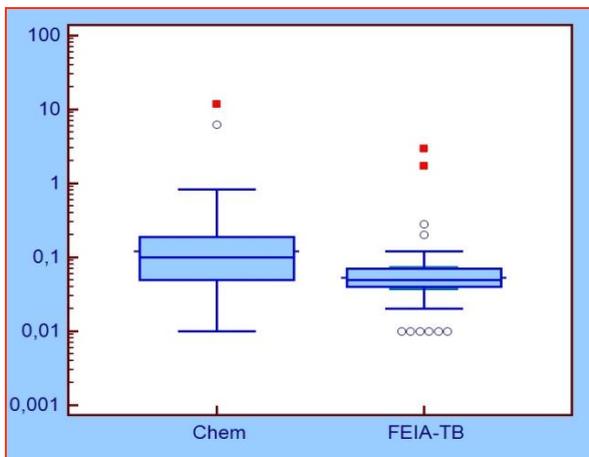


Fig. 5.4

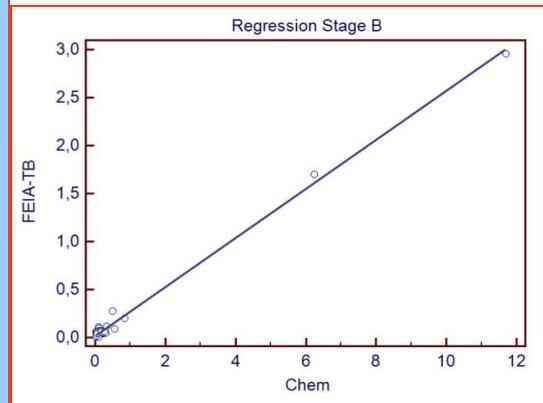


Fig. 5.5

Fig. 5.4 e Fig. 5.5 : Gruppo B classificazione secondo ACVIM Consensus Statement, Chem (Chemiluminescence, IMMULITE 2000[®]), FEIA-TB (Fluorescence Enzyme Immuno Assay-Tosoh Biosciences).

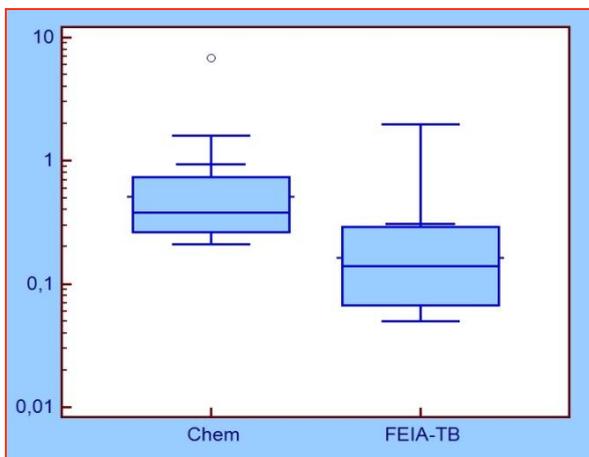


Fig.5.6

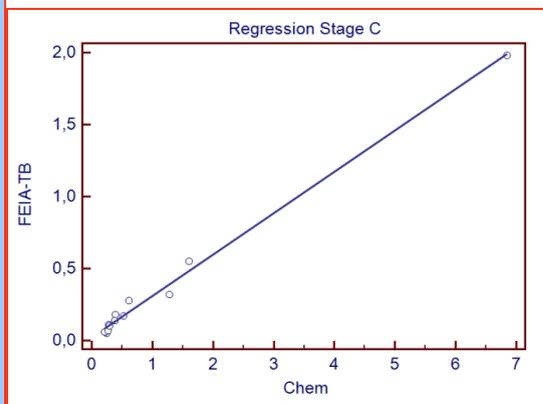


Fig. 5.7

Fig. 5.6 e Fig. 5.7: Gruppo C classificazione secondo ACVIM Consensus Statement, Chem (Chemiluminescence, IMMULITE 2000[®]), FEIA-TB (Fluorescence Enzyme Immuno Assay-Tosoh Biosciences)

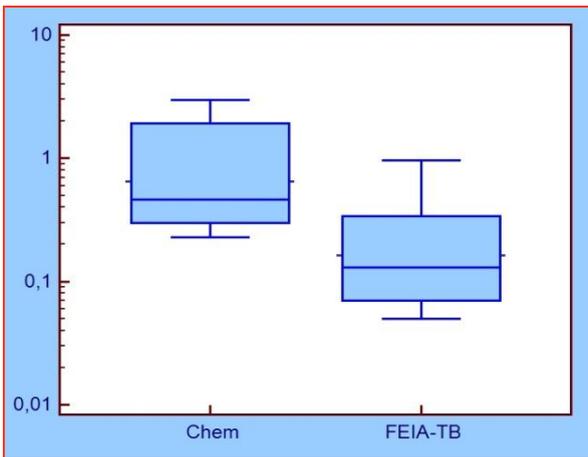


Fig. 5.8

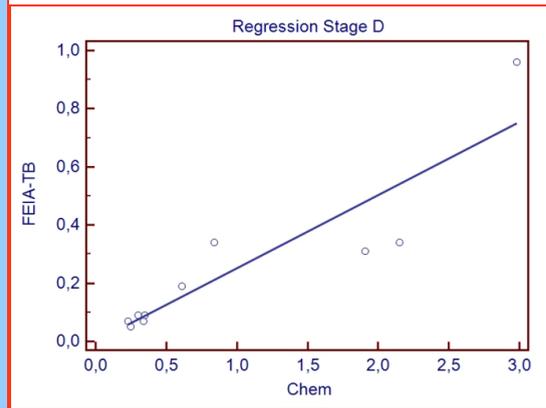


Fig. 5.9

Fig. 5.8 e Fig. 5.9: Gruppo D classificazione secondo ACVIM Consensus Statement, Chem (Chemiluminescence, IMMULITE 2000®), FEIA-TB (Fluorescence Enzyme Immuno Assay-Tosoh Biosciences).

Le concentrazioni di cTnI dei soggetti con MMVD aumentava in modo proporzionale al grado di insufficienza cardiaca come nelle fig da 5.2 a 5.9. Durante il periodo di studio sono stati sottoposti ad eutanasia per patologia cardiaca 18 soggetti, 8 appartenevano alla classe D e 10 alla classe C. Questi soggetti avevano mostrato valori tra i più alti di cTnI all'interno del gruppo.

BNP

Dei 91 cani, 8 di loro sono stati testati anche per BNP con metodica IDEXX e Tosoh, alla classe B fanno parte 4 soggetti, alla C 3 soggetti e uno solo della classe D.

ACVIM	FEIA-TB (MEDIA±DS)	IDEXX (MEDIA±DS)
B	43,99±6,08	2693±321
C	49,80±7,06	5109±2899
D	51,25	1637

Tab. 5.10

ACVIM	r	r ²	p
B	-0,5109	0,41	0,49
C	0,6404	0,26	0,55
D	0,36	0,31	0,42

Tab.5.11 Confronto tra BNP IDEXX vs.BNP FEIA-TB in cani con MMVD divisi secondo ACVIM Consensus.

I risultati di IDEXX sono espressi in pmol/L (Tab.5.10), mentre quelli del Tosoh in pg/ml. Per trasformare tutto in pmol/L abbiamo usato come fattore di conversione 8,571.

In questo modo abbiamo potuto confrontare i risultati con la stessa unità di misura, anche se la metodica FEIA-TB ha dei valori di riferimento diversi dalla metodica usata dal test Cardiopet® di IDEXX.

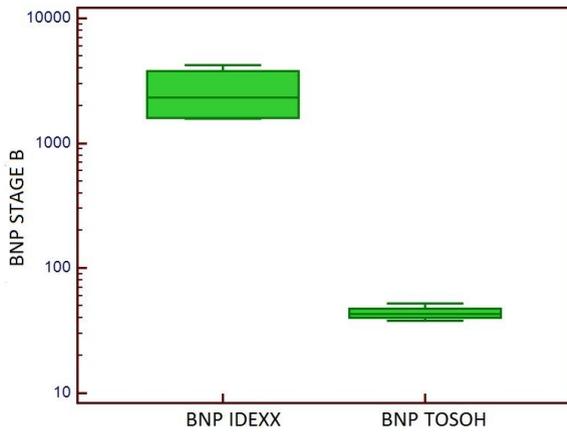


Fig. 5.12

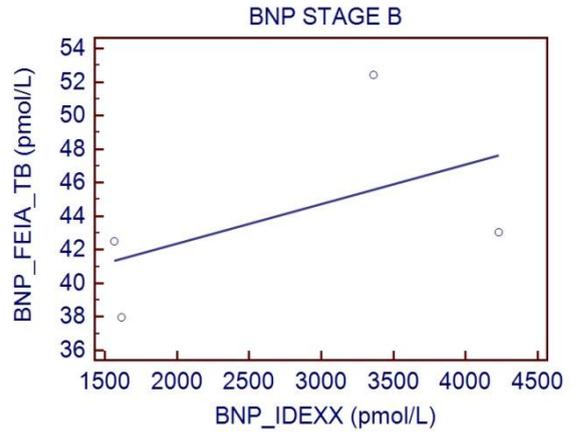


Fig.5.13

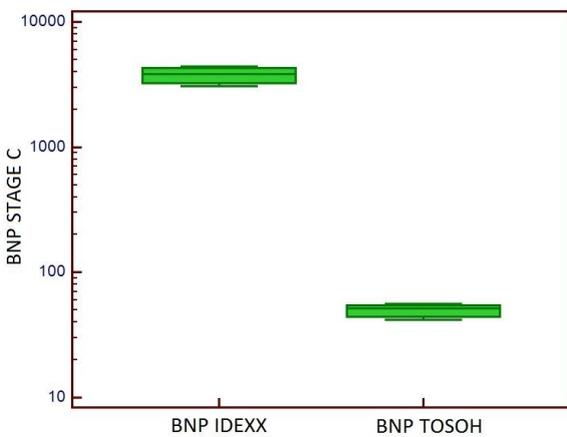


Fig 5.14

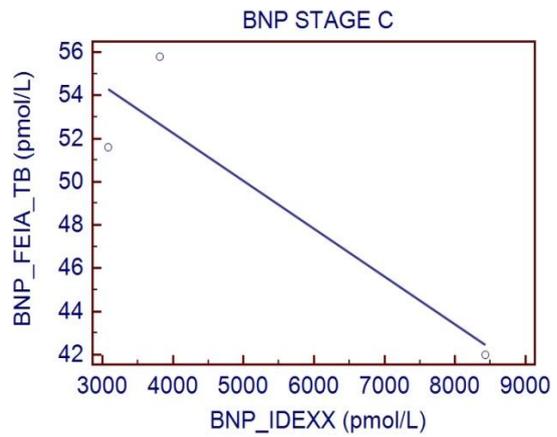


Fig. 5.15

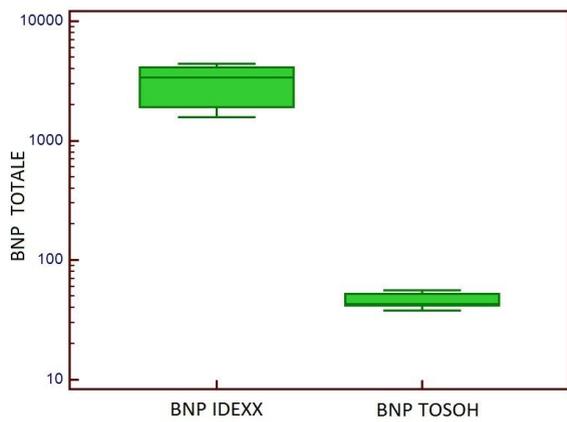


Fig 5.16

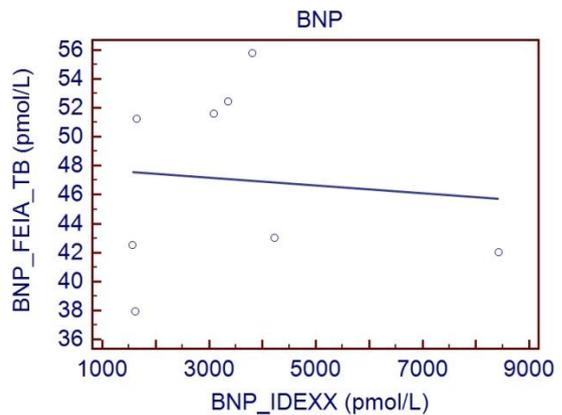


Fig 5.17

Fig 5.12,5.14,5.16: Box-plot delle differenze statistiche fra le due metodiche di laboratorio e la concentrazione di BNP. In ogni boxplot sono rappresentati i valori minimi e massimi, la mediana è rappresentata dalla linea all'interno del box. Gli estremi del box rappresentano il 25 e il 75%.

Fig. 5.13,5.15,5.17: Grafici di regressione lineare delle correlazioni esistenti fra i valori di BNP calcolati con tecnica IDEXX e tecnica FEIA-TB.

SEROTONINA

20 pazienti su 91 sono stati testati per la serotonina con metodica ELISA, i soggetti sono classificati in base alla classe ACVIM. Della classe B fanno parte 16 soggetti, della classe C 4 soggetti e della classe D solo un solo soggetto.

ACVIM	ELISA (MEDIA±DS)
B	756±61,56
C	803±53,54
D	827

Tab 5.18

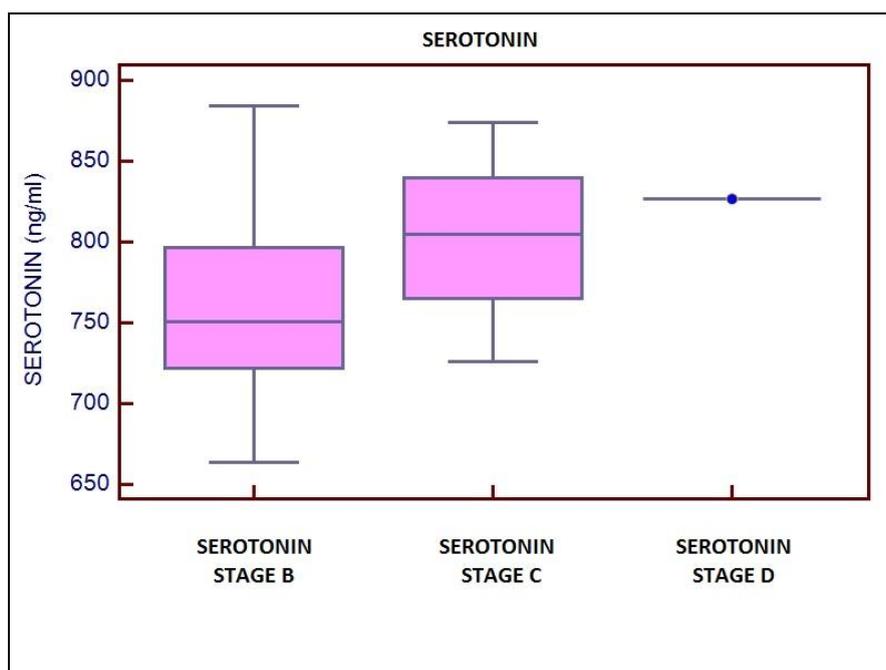


Fig. 5.19

Fig 5.19: Box-plot delle differenze statistiche fra concentrazione della serotonina e classe ACVIM.

Come si evince dal grafico per il gruppo Stage B la mediana è di 750 ng/mL, mentre la classe Stage C ha una mediana di circa 800, mentre l'unico soggetto della classe Stage D ha una mediana di circa 825 ng/mL.

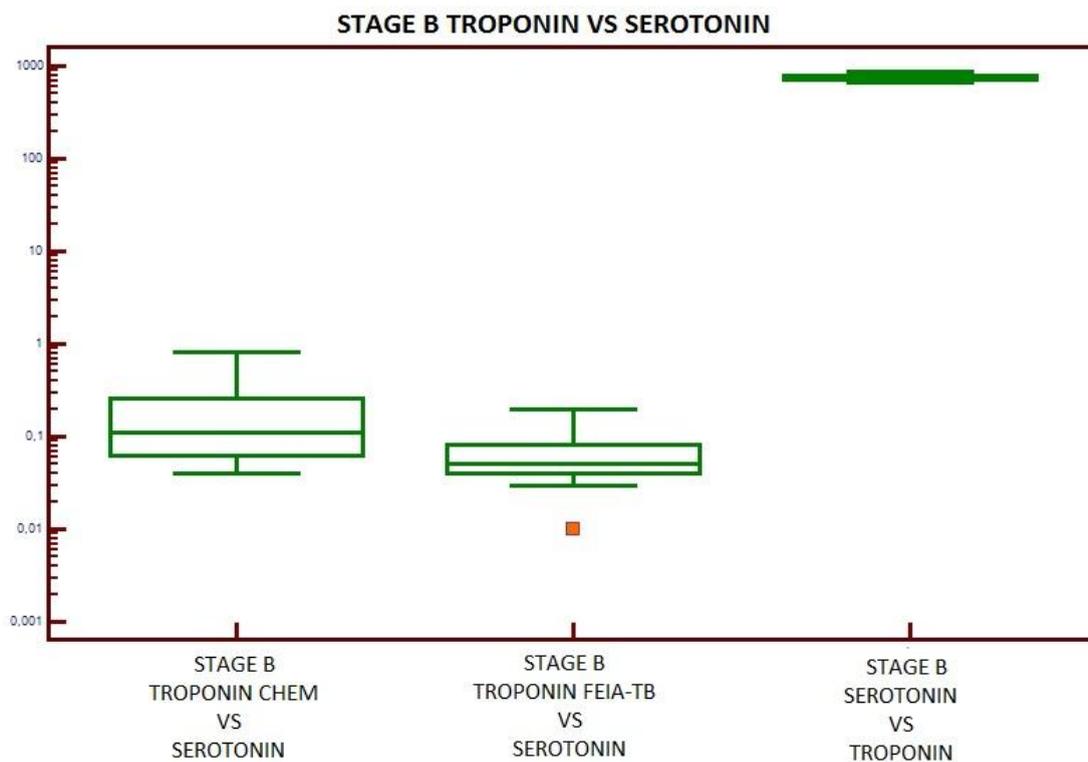


Fig. 5.20

Fig.5.20: Box-plot di confronto tra la troponina valutata con i due analizzatori e la serotonina in soggetti appartenenti allo stadio B. I valori in asse Y sono espressi in scala logaritmica per rendere possibile il confronto.

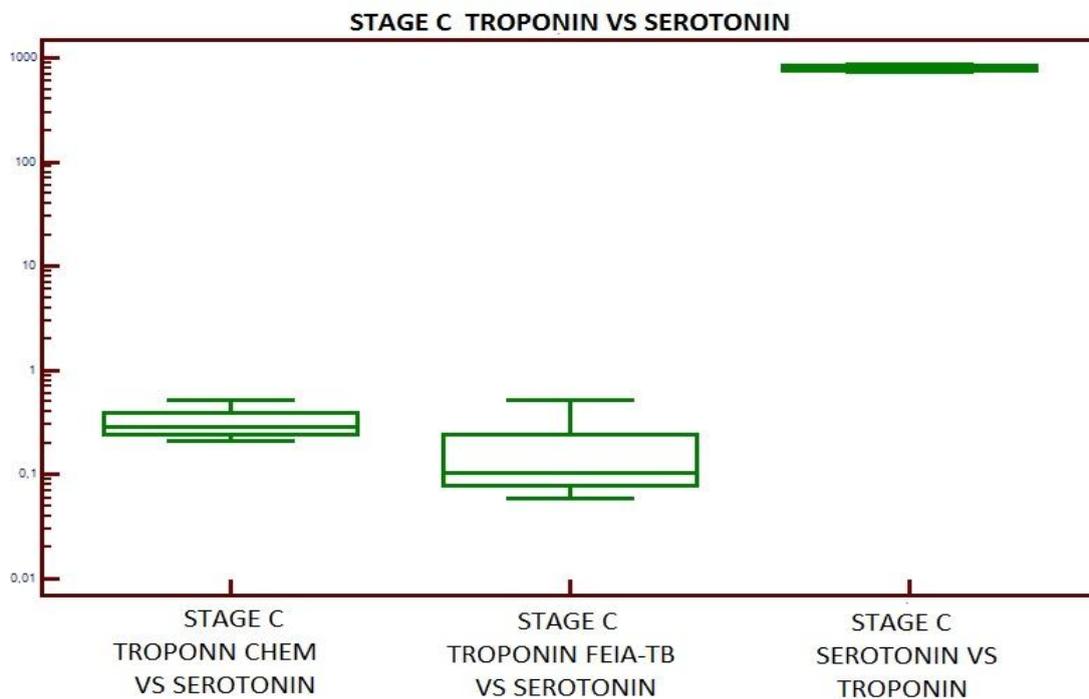


Fig.5.21

Fig.5.21: Box-plot di confronto tra la troponina valutata con i due analizzatori e la serotonina in soggetti di stadio C. I valori in asse Y sono espressi in scala logaritmica per rendere possibile il confronto.

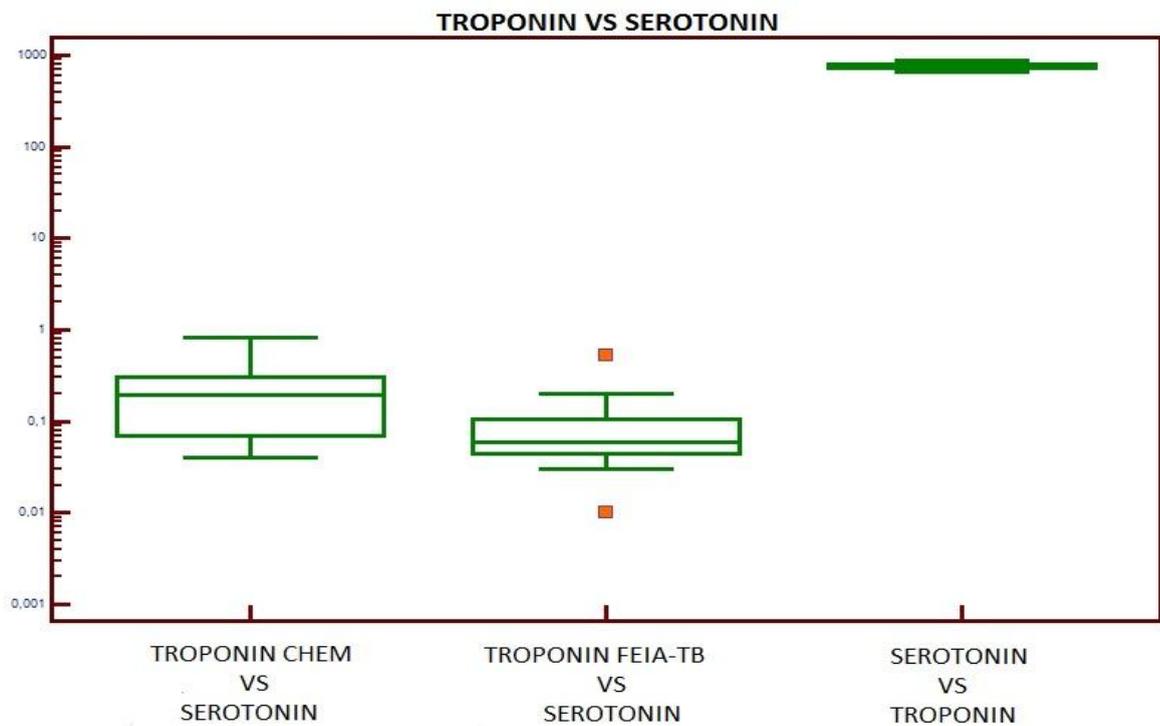


Fig. 5.22

Fig.5.22: Box-plot di confronto tra la troponina valutata con i due analizzatori e la serotonina in tutti i soggetti.

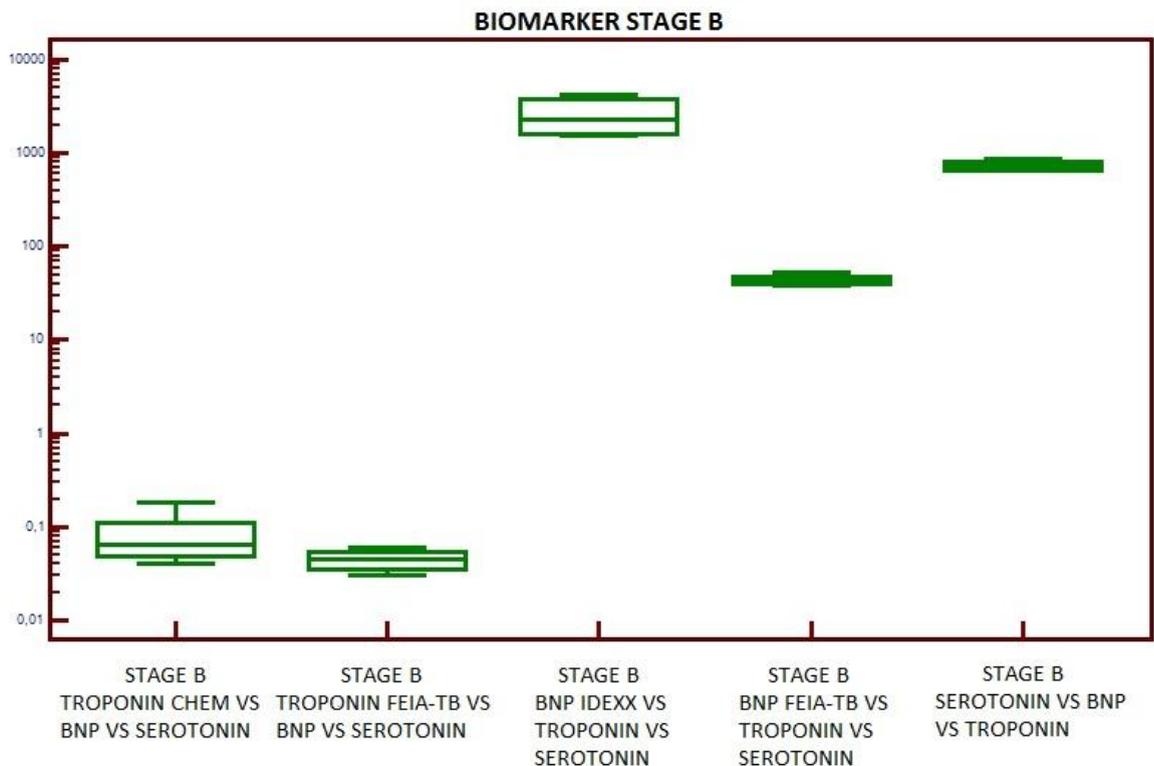


Fig. 5.19

Fig.5.19: Box-plot di confronto tra i tre biomarcatori in soggetti di stadio B. I valori in asse Y sono espressi in scala logaritmica per rendere possibile il confronto.

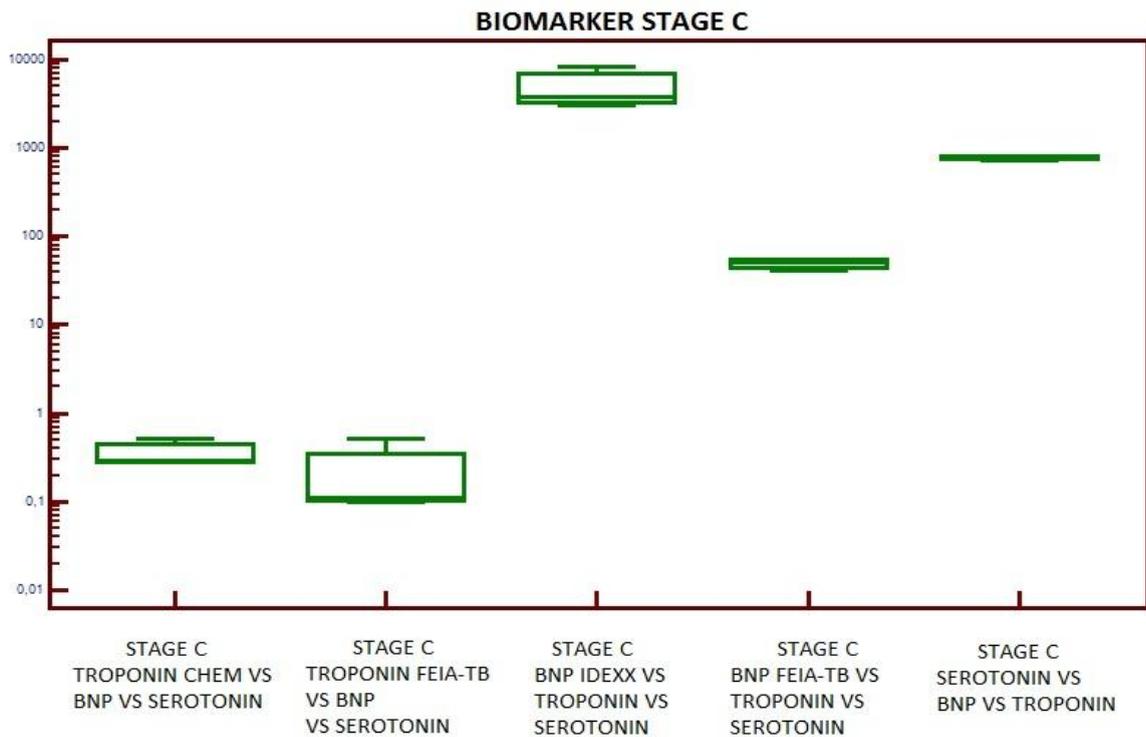


Fig. 5.23

Fig.5.23: Box-plot di confronto tra i tre biomarcatori in soggetti di stadio C. I valori in asse Y sono espressi in scala logaritmica per rendere possibile il confronto.

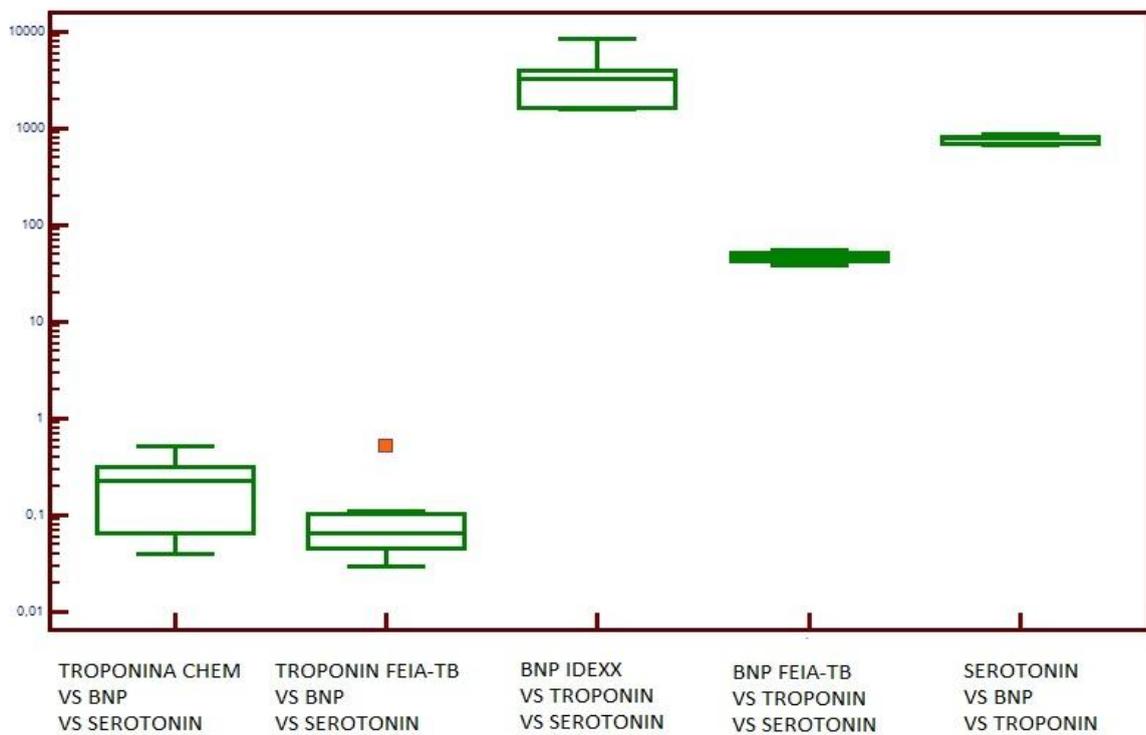


Fig. 5.24: Box-plot dei tre biomarcatori valutati con i corrispettivi analizzatori in tutti i soggetti.

CAPITOLO VI: DISCUSSIONE

Analizzando i risultati, emerge, in accordo con la bibliografia, che vi è una maggior probabilità di sviluppare endocardiosi mitralica nei soggetti maschi anziani^{218,186, 189}. La maggior parte dei soggetti che hanno sviluppato MMVD in età precoce (< 10 anni) erano CKCS, razza questa, con una forte predisposizione genetica allo sviluppo di MMVD¹⁵⁵. L'entità del soffio e la velocità del rigurgito causati dall'endocardiosi sono risultati maggiori a carico della valvola mitrale rispetto alla tricuspide, questo in accordo con quanto descritto in letteratura¹⁴⁶.

Il cut-off del test consigliato dalla ditta produttrice dell'analizzatore (IMMULITE 2000[®]) è 0,5 ng/ml, ma in questo studio è stato utilizzato il valore minimo di troponina sierica rilevabile da parte dell'apparecchio (0,2 ng/ml) perché in letteratura la concentrazione di cTnI negli animali sani è nettamente inferiore a 0,2 ng/ml e 0,5 ng/ml è già un valore considerato patologico¹⁸⁹. In accordo con questa considerazione anche per Tosoh è stata considerata patologica una concentrazione di troponina > 0,09 ng/ml. Questo lavoro ha evidenziato una sensibilità sovrapponibile nell'identificare i cani con danno miocardico: tutti i soggetti con cTnI ≥ 0,09 ng/ml (Tosoh[®]) mostravano valori di cTnI ≥ 0.2 (IMMULITE 2000[®]). E' stato osservato che i rilievi ecocardiografici sono in correlazione con i livelli sierici della troponina¹⁹¹.

I rilievi ecocardiografici, in particolare il rapporto atrio sinistro aorta (LA/Ao), sono risultati strettamente correlati alla concentrazione di cTnI infatti, i soggetti con cTnI ≥ 0,09 ng/ml (Tosoh[®]) e cTnI ≥ 0.2 (IMMULITE 2000[®]) hanno mostrato un rapporto LA/Ao >1,6, indice questo di dilatazione cardiaca e rimodellamento cardiaco a seguito di disordini volumetrici e pressori causati dall'insufficienza valvolare¹. In questo studio i parametri di funzionalità del ventricolo sinistro, frazione d'eiezione (EF) e frazione d'accorciamento (SF), sono aumentati nel 57% nei pazienti affetti da endocardiosi mitralica di grado medio, infatti il sangue incontra minor resistenza durante la sistole perché una parte refluisce nell'atrio. Con l'aggravarsi della patologia aumenta il sovraccarico volumetrico (aumento

dell'EDVI) e i differenziali pressori cambiano, quindi EF e FS tendono ad assumere nuovamente valori normali per poi diminuire, mentre contestualmente aumenta ESVI a indicare un deficit sistolico: questi sono indici prognostici negativi¹⁷⁷.

La concentrazione di cTnI circolante, valutata con entrambe le metodiche di analisi, aumenta progressivamente al diminuire della capacità contrattile del cuore e della gittata, parametri che indicano un danno miocardico crescente¹⁸⁹. Questo risultato è particolarmente interessante perché ha permesso di distinguere, precocemente, rispetto ai parametri ecocardiografici, i soggetti in cui la patologia ha una gravità maggiore e che necessitano di un importante intervento terapeutico sotto stretto controllo medico^{78, 236}.

La troponina (cTnI) è risultata essere un biomarcatore sensibile nella diagnosi e nella valutazione della gravità dell'endocardiosi mitralica. Questa proteina può rilevarsi utile nell'individuare precocemente pazienti che necessitano di un immediato intervento terapeutico e nel monitoraggio della terapia oltre a rappresentare uno specifico indicatore prognostico²³⁷.

Dal nostro studio e soprattutto dai grafici (box-plot) riguardanti le due metodiche di analisi del BNP, si evince che non vi è correlazione tra i due analizzatori; mentre il BNP calcolato con metodo FEIA-TB ha un trend di incremento correlato all'aumento della gravità dell'endocardiosi, il BNP valutato tramite tecnica IDEXX, non segue un trend di incremento correlabile con il grado di endocardiosi mitralica. Questo risultato non è conforme con quelli ritrovati in bibliografia, in cui si assegna al test IDEXX il ruolo di "gold standard".

Una giustificazione a tale non conformità potrebbe essere il metodo di stoccaggio dei suddetti campioni, che sono stati inviati al laboratorio di analisi dopo non oltre una settimana dal prelievo; l'altro motivo, che è risultato a nostro avviso la causa maggiore per la quale vi è una non conformità dei risultati, è il numero limitato di campioni, soprattutto l'unico paziente classificato nel gruppo ACVIM D, che altera la validità per quella classe di studio.

Ad oggi il BNP e in particolare l'NT-proBNP è considerato uno dei più affidabili markers neuromonali di patologie cardiache nei cani^{3, 238, 239}.

Così come per la MMVD che ha un'alta incidenza nei confronti di determinate razze, fasce di età e sesso, anche nei confronti di NT-proBNP è stato condotto uno studio per creare degli intervalli di riferimento in soggetti sani di razze diverse. Da questo studio²⁴⁰, si realizzarono dei range di riferimento da usare per valutare al meglio l'NT-proBNP in base alla razza di appartenenza; per quanto riguarda il sesso, in un altro studio è stato osservato che i pazienti di sesso femminile avevano concentrazioni più alte dei maschi²⁴¹, al contrario nessuna età o peso corporeo avevano effetti sulle concentrazioni di BNP, come viene dimostrato in molti studi^{234 48, 87, 242}.

Il nostro elaborato si può inquadrare nel filone dei lavori che cercano di confermare se, esiste una correlazione tra le concentrazioni del peptide natriuretico di tipo B e la gravità dell'endocardiosi. Attualmente in medicina umana il BNP rappresenta, per la sua sensibilità, il "marker" di insufficienza cardiaca maggiormente utilizzato per la stratificazione prognostica dei pazienti e come guida nella gestione della terapia. Inoltre, recenti studi in campo veterinario, suggeriscono come il BNP possa rappresentare un valido test aggiuntivo nei cani cardiopatici²⁴³.

Come si evince dal nostro lavoro, le concentrazioni di NT-proBNP sono correlate al grado di insufficienza mitralica così come ritrovato anche da Serres e colleghi, che hanno evidenziato come, le concentrazioni di NT-proBNP hanno una forte correlazione con la severità clinica dell'MMVD e che questa molecola è in grado di predire la mortalità da cause cardiache in cani affetti da endocardiosi sintomatica²¹³. Nei soggetti presi in esame nel nostro studio viene fatto un solo campionamento e viene associata tale concentrazione allo stadio clinico del cane in quel determinato momento, si ipotizza, quindi, che dosaggi ripetuti dell'NT-proBNP potrebbero essere utili nel guidare le terapie; uno studio pilota di Achen e colleghi aveva evidenziato, che le variazioni delle concentrazioni di questa molecola, in cani affetti da MMVD, erano sempre in accordo con le decisioni terapeutiche prese dai cardiologi²⁴⁴.

Nei pazienti in terapia periodicamente monitorati tramite le convenzionali metodiche diagnostiche, conoscendo solo gli esiti di tali indagini ma non i livelli di NT-proBNP, si decideva se variare o meno il dosaggio del diuretico. I risultati ottenuti suggerivano che le concentrazioni del suddetto biomarker, cambiavano in concomitanza con le condizioni cliniche e quindi, risultavano un aiuto nelle scelte terapeutiche del cardiologo, questo però, è l'unico studio a riguardo e visto che i lavori in medicina umana hanno risultati contraddittori, saranno necessari ulteriori ricerche.

Così come si evince dal nostro studio, anche Oyama nel suo lavoro, considera che, le concentrazioni di NT-proBNP siano positivamente correlate con le misurazioni ecocardiografiche e radiografiche di peggioramento della malattia; Moonarmart nel 2010 condusse uno studio al fine del quale, si confermava la correlazione tra ingrandimento atriale e concentrazione di tale biomarker²⁰³.

Nonostante ciò, il dosaggio di NT-proBNP non è scevro da alcune limitazioni, ad esempio patologie concomitanti (come problemi renali, patologie infettive, ipertensione sistemica e polmonare) e la somministrazione di farmaci che variano il volume ematico (diuretici), possono influenzarne le concentrazioni; inoltre, la stabilità della molecola in vivo è altamente tempo e temperatura-dipendente: ecco perché è utile eseguire un monitoraggio insieme alla valutazione completa del quadro clinico. Considerato che l'NT-proBNP è in parte escreto tramite la filtrazione renale, nei pazienti con problemi renali e diminuita filtrazione glomerulare, i valori ottenuti sono maggiori rispetto a quelli di pazienti non affetti da tali patologie, dando a volte dei falsi positivi o negativi. Questo ultimo fenomeno può però essere parzialmente ovviato utilizzando valori normalizzati per l'azotemia. È inoltre necessario ricordare che, oltre a variare in corso di patologia i livelli di NT-proBNP fluttuano in uno stesso paziente da un giorno all'altro, probabilmente a causa del ritmo circadiano o delle variazioni del volume ematico, nonché al variare del metodo di raccolta dei campioni, di maneggiamento e dei protocolli di spedizione, che possono influire sui risultati ottenuti^{49, 71}.

Per questo motivo la misura delle concentrazioni di NT-proBNP deve essere sempre associato ad uno screening cardiologico completo.

Il nostro studio, ipotizza, non solo che ci sia una correlazione tra serotonina e la gravità dell'endocardiosi, ma in primis, che la suddetta molecola svolga un ruolo chiave nell'endocardiosi mitralica. Numerosissimi studi sono stati fatti riguardanti la serotonina in pazienti affetti da MMVD^{161 165, 222, 223 125, 132, 225, 127, 162}.

Per quanto riguardano i risultati della serotonina si può notare facilmente dal grafico box-plot 5.19, che le concentrazioni dei pazienti aumentano linearmente all'aggravarsi della patologia. I soggetti classificati nel gruppo ACVIM B, hanno concentrazioni di circa 756 ng/mL \pm 61, quelli della classe ACVIM C 803 \pm 53, mentre l'unico soggetto nel gruppo ACVIM D, presenta una concentrazione di 827 ng/mL.

Questi risultati appaiono correlati con lo studio di Arndt e colleghi, i quali hanno dimostrato un significativo aumento della concentrazione di serotonina sierica in cani affetti da MMVD rispetto a pazienti sani, assegnando così alla 5HT una funzione importante nella patogenesi dell'endocardiosi²²⁸; così come sono correlati allo studio di Oyama sotto riportato. Nel 2013 lo studioso Ljungvall però, arriva a conclusioni diverse e sulla base dei risultati del suo lavoro afferma che vi è sì, una relazione tra 5HT e MMVD, ma che la concentrazione del neormone diminuisce all'aumentare della gravità della patologia; in più correla questi dati anche al rapporto LA/Ao, LVIDd e LVIDs. L'autore spiega i risultati ottenuti, suggerendo che la serotonina gioca un ruolo maggiore nelle prime fasi dell'endocardiosi e quindi di contro, ha un ruolo minore negli stadi avanzati-gravi della patologia²³⁰.

Dalla nostra abbiamo i numerosi limiti e la non uniformità dei soggetti nello studio di Ljungvall. I cani del suddetto lavoro che fanno parte del gruppo dei sani, sono per la maggioranza CKCS, che come abbiamo visto più volte, è una razza altamente predisposta alla MMVD; quindi, i CKCS avrebbero potuto avere delle concentrazioni maggiori di 5TH, anche senza essere considerati affetti. Al contrario nel nostro studio, anche se non è presente un gruppo di controllo, non vi sono animali di suddetta razza.

Per quanto riguarda l'età dei pazienti, nel nostro studio, l'età media è di 11,6 anni e come ampiamente dimostrato, la MMVD colpisce i cani anziani e peggiora con l'avanzare dell'età¹⁷¹, mentre nello studio di Ljunvall i pazienti avevano un'età compresa tra i 4,5 del gruppo dei sani e i 9,9 dei cani con MMVD grave; questo può quindi influire sulla veridicità dei risultati.

Anche nello studio di Arndt si rilevava una regressione lineare di serotonina rispetto all'età del gruppo di controllo e dei cani predisposti alla patologia mitralica, ma anche in questo caso il fatto di avere come gruppo di riferimento dei soggetti predisposti alla patologia, ne altera il risultato²²⁸.

Nel nostro studio non è stata trovata una correlazione tra le concentrazioni di serotonina e il rapporto LA/Ao; riguardo a questo dato nel 2008 Borgarelli aveva associato l'ingrandimento atriale ad un rischio maggiore di morire per qualsiasi patologia²¹⁸ e come già visto Ljungvall lo associa inversamente alle concentrazioni di 5TH.

Analizzando tutti e tre i biomarcatori insieme, grazie ai grafici box-plot, si nota che hanno un trend simile, cioè aumentano, all'aumentare della gravità dell'endocardiosi; i risultati però non sono statisticamente significativi; questo può essere determinato dal numero ristretto di pazienti nel nostro studio. Soffermandoci sui risultati ottenuti sui tre biomarcatori insieme, si prenderà come esempio un articolo molto interessante di Trafny e Oyama.

Lo studio di Trafny e Oyama del 2012²⁴⁵, porta avanti un lavoro molto simile a quello intrapreso in questa tesi; risulta comunque l'unico articolo finora in circolazione ad usare nello studio della MMVD ben 4 biomarcatori cardiaci: CRP, cTnI, NTproBNP e 5HT. I soggetti inclusi nel gruppo di studio sono tutti della stessa razza: "Norfolk Terrier", a differenza del nostro lavoro nel quale sono presenti cani di razze diverse. Avere tutti cani della stessa razza, risulta un'agevolazione per la validità dei risultati, infatti, quanto più la popolazione in studio è simile, tanto più veritieri saranno i risultati; considerando il fatto che la nostra patologia (MMVD) ha una predisposizione maggiore nei cani di taglia piccola, come lo è, la razza

in questione. Altro punto da tenere in considerazione è che, studi descrittivi focalizzati su una particolare razza possono portare ad una migliore comprensione della fisiopatologia dell'endocardiosi, la quale risulta ad oggi in parte sconosciuta, a causa delle molte eziologie. Studi mirati su una razza possono portare alla possibile individuazione di scostamenti diagnostici normali, della popolazione canina in generale e fornire una base per il confronto con le altre razze di cani.

Le indagini condotte sul gruppo di Norfolk sono le stesse che si ritrovano nel nostro lavoro. Gli animali sono stati valutati attraverso un esame fisico, ECG e un'indagine ecocardiografica ed eco-Doppler, includendo i seguenti parametri: LA/Ao, LVIDs, LVIDd, lunghezza dei lembi valvolari e spessore massimo indicizzati sulla BSA.

Le indagini biochimiche sulla troponina, NT-proBNP e serotonina sono state ottenute con le stesse metodiche usate in questo lavoro e a sua volta, i risultati ottenuti analizzati con lo stesso sistema statistico.

I soggetti sono stati classificati secondo metodo ISACHC (International Small Animal Cardiac Health Concil) a seconda della gravità della MMVD, includendo un gruppo di soggetti sani (gruppo di controllo).

Dei 48 cani, 41 avevano una conclamata malattia degenerativa della valvola mitralica, i restanti 7 erano sani. I risultati sulle concentrazioni dei 3 biomarcatori sono riportati nella tabella sottostante.

ISACHC	Troponina cardiaca I (mg/dL)	NT-proBNP (pmol/L)	Serotonina (ng/mL)
	Media (IQR)	Media (SD)	Media (IQR)
0	0.19 (0.19-0.20)	386 (218)	414 (220-584)
1	0.19 (0.19-0.20)	595 (339)	604 (464-812)
1b	0.19 (0.19-0.19)	997 (778)	618 (574-826)
<i>valoreP</i>	<i>P</i> = 0.12	<i>P</i> = 0.019	<i>P</i> = 0.08

IQR: interquartile; SD: deviazione standard;

Come si evince dalla tabella, le concentrazioni di NT-proBNP sono più alte nei soggetti con MMVD di grado severo; non ci sono significative differenze

per la troponina, mentre la serotonina ha una mediana non significativamente alta nei soggetti con endocardiosi più grave.

In questo studio così come negli altri lavori riguardanti questo argomento, si focalizza l'attenzione sull'uso dei biomarker come un aiuto molto importante nella fisiopatologia della malattia degenerativa mitralica³.

I risultati ottenuti su l'NT-proBNP, concordano con lo studio di Oyama sui CKCS in cui le concentrazioni di tale biomarcatore erano elevate. Il fatto che la serotonina non abbia raggiunto livelli statistici significativi, necessita comunque di studi aggiuntivi.

I limiti del nostro studio sono stati:

- il numero ridotto dei casi, per quanto riguarda le analisi di BNP e della serotonina, che può avere ridotto il potere statistico della nostra analisi; una maggior numerosità di soggetti avrebbe, forse, minimizzato le deviazioni standard e migliorato perciò il differenziamento tra i gruppi.
- l'assenza di un gruppo di controllo costituito da soggetti sani, che avrebbero potuto in alcuni casi confermare o smentire risultati ritrovati in altri studi.
- mancanza di pazienti appartenenti alla razza Cavalier King Charles Spaniel, altamente predisposta alla MMVD; questo evento a nostro avviso non è un vero e proprio limite, perchè utilizzare dei soggetti predisposti e inglobarli nel gruppo dei sani o in qualsiasi altro gruppo, porta, come abbiamo visto in altri studi, a dei risultati falsati o comunque sottostimati o soprastimati.
- aver eseguito l'esame sui pazienti in un solo controllo, senza averne potuto seguire non solo gli esami biochimici nel tempo ma anche il follow-up della patologia.
- utilizzo di 4 variabili come: troponina, BNP, serotonina e MMVD, ognuna delle quali ha di per sé propri limiti o fattori predisponenti.

BIOMARKER	FATTORI PREDISponentI E LIMITAZIONI
MMVD	Razza, età (anziani), sesso (maschi), taglia (medio-piccola), geni.
TROPONINA	Patologie renali, età (anziani), patologie cardiache diverse dalla MMVD, allenamento intensivo.
BNP	Patologie renali, ipertensione polmonare o sistemica, malattie cardiache diverse dalla MMVD, somministrazione di diuretici, prelievo e stoccaggio del campione, variabilità biologica.
SEROTONINA	Razza, sesso (femmine), MMVD, patologie cardiache diverse dalla MMVD.

CAPITOLO VII: CONCLUSIONI

Nel nostro studio abbiamo potuto rilevare che: esiste una buona correlazione tra le concentrazioni ottenute per la troponina con tecnica FEIA-TB e Chem; non vi è una correlazione, statisticamente valida, tra la metodica FEIAT-TB e IDEXX per il BNP; sia la troponina che il BNP sono correlati al grado di endocardiosi; la concentrazione di troponina, BNP e serotonina aumentano con il progredire dell'endocardiosi mitralica.

Una sfida molto importante sarebbe quella di determinare, non solo se esiste una combinazione di marker ottimale per ciascuna delle circostanze in esame, ma aggiungere a questi biomarcatori la serotonina per ampliare il ventaglio delle possibili informazioni ottenute tramite i test di laboratorio. Ci sono molti studi in medicina umana che hanno dimostrato che l'utilizzo di più markers risulta maggiormente fruttuosa rispetto a singoli marcatori^{246, 247}. Questo è un lavoro preliminare, seppure su di una casistica limitata, sullo studio dei biomarker cardiaci. La relazione da noi ottenuta tra le concentrazioni di questi biomarker e il peggioramento della MMVD dovrà essere confermata da ulteriori studi, prima di poter affermare che questi rappresentano un buon indice diagnostico e prognostico delle patologie cardiache del cane al punto da poter infine essere introdotte nella pratica clinica.

Bibliografia

- 1.Oyama MA. Using cardiac biomarkers in veterinary practice. The Veterinary clinics of North America Small animal practice. 2013; **43**(6): 1261-72, vi.
- 2.Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001; **69**(3): 89-95.
- 3.Boswood A. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology. 2009; **11 Suppl 1**: S23-32.
- 4.Braunwald E. Biomarkers in heart failure. The New England journal of medicine. 2008; **358**(20): 2148-59.
- 5.Meinardi MT, van der Graaf WT, van Veldhuisen DJ, Gietema JA, de Vries EG, Sleijfer DT. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity. Cancer Treat Rev. 1999; **25**(4): 237-47.
- 6.Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G, et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. Circulation. 2004; **109**(22): 2749-54.
- 7.Lock EA, Bonventre JV. Biomarkers in translation; past, present and future. Toxicology. 2008; **245**(3): 163-6.
- 8.Dolci A, Panteghini M. The exciting story of cardiac biomarkers: from retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2006; **369**(2): 179-87.
- 9.Collinson PO, Garrison L, Christenson RH. Cardiac biomarkers—A short biography. Clinical biochemistry. 2014.
- 10.Karmen A, Wroblewski F, Ladue JS. Transaminase activity in human blood. Journal of Clinical Investigation. 1955; **34**(1): 126.
- 11.Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975; **256**(5517): 495-7.
- 12.[cited; Available from: https://www.google.it/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=ja&uact=8&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.bayes.it%2Fcerni%2FMarcatori_danno_mio_cardico.pdf&ei=XFLJVLmuAY6sPY-5gdAH&usg=AFQjCNHKIPPz4UBOeYlkiQz7wdRoyR3TmQ&sig2=FnpOLKI61ZUbtbL0VOlvVw
- 13.Aspromonte N, Di Tano G, Latini R, Masson S, Valle R, Emdin M. [Role of biomarkers for risk stratification in the tailored follow-up of heart failure patients]. Giornale italiano di cardiologia. 2010; **11**(5 Suppl 2): 17S-23S.
- 14.Pagani F. Biochimica dei marcatori di lesione miocardica.
- 15.Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. Circulation research. 2003; **92**(7): 715-24.
- 16.Adams JE, 3rd, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH, et al. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. Circulation. 1993; **88**(1): 101-6.
- 17.Chen YN, Wei JR, Zeng LJ, Wu MY. Monitoring of cardiac troponin I in patients with acute heart failure. Ann Clin Biochem. 1999; **36 (Pt 4)**: 433-7.
- 18.O'Brien PJ, Smith DE, Knechtel TJ, Marchak MA, Pruiomboom-Brees I, Brees DJ, et al. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. Laboratory animals. 2006; **40**(2): 153-71.
- 19.Sleeper MM, Clifford CA, Laster LL. Cardiac troponin I in the normal dog and cat. Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine. 2001; **15**(5): 501-3.
- 20.Cornelisse CJ, Schott HC, 2nd, Olivier NB, Mullaney TP, Koller A, Wilson DV, et al. Concentration of cardiac troponin I in a horse with a ruptured aortic regurgitation jet lesion and ventricular tachycardia. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2000; **217**(2): 231-5.
- 21.Varga A, Schober KE, Walker WL, Lakritz J, Michael Rings D. Validation of a commercially available immunoassay for the measurement of bovine cardiac troponin I. Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine. 2009; **23**(2): 359-65.

22. Langhorn R, Tarnow I, Willesen JL, Kjølgaard-Hansen M, Skovgaard IM, Koch J. Cardiac troponin I and T as prognostic markers in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2014; **28**(5): 1485-91.
23. Linde A, Summerfield NJ, Sleeper MM, Wright FB, Clifford CA, Melgarejo T, et al. Pilot study on cardiac troponin I levels in dogs with pericardial effusion. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2006; **8**(1): 19-23.
24. Shaw SP, Rozanski EA, Rush JE. Cardiac troponins I and T in dogs with pericardial effusion. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2004; **18**(3): 322-4.
25. Baumwart RD, Orvalho J, Meurs KM. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *American journal of veterinary research*. 2007; **68**(5): 524-8.
26. Oyama. La valutazione della funzione cardiaca attraverso i test neuroormonali: uso corrente e future applicazioni. 53° Congresso Nazionale Multisala SCIVAC; 2006 19-21 May; Rimini; 2006.
27. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Jr. The evolution of the natriuretic peptides - Current applications in human and animal medicine. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2009; **11 Suppl 1**: S9-21.
28. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life sciences*. 1981; **28**(1): 89-94.
29. Kangawa K, Fukuda A, Kubota I, Hayashi Y, Minamitake Y, Matsuo H. Human atrial natriuretic polypeptides (hANP): purification, structure synthesis and biological activity. *J Hypertens Suppl*. 1984; **2**(3): S321-3.
30. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *The New England journal of medicine*. 1998; **339**(5): 321-8.
31. Takei Y, Ogoshi M, Inoue K. A 'reverse' phylogenetic approach for identification of novel osmoregulatory and cardiovascular hormones in vertebrates. *Front Neuroendocrinol*. 2007; **28**(4): 143-60.
32. Vesely DL. Natriuretic peptides and acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; **285**(2): F167-77.
33. Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumura K, Obata K, et al. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *The Journal of clinical investigation*. 1989; **83**(1): 298-305.
34. Gunning M, Brenner BM. Urodilatin: a potent natriuretic peptide of renal origin. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993; **2**(6): 857-62.
35. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*. 1988; **332**(6159): 78-81.
36. Porter JG, Arfsten A, Palisi T, Scarborough RM, Lewicki JA, Seilhamer JJ. Cloning of a cDNA encoding porcine brain natriuretic peptide. *The Journal of biological chemistry*. 1989; **264**(12): 6689-92.
37. Yamamoto K, Burnett JC, Jr., Jougasaki M, Nishimura RA, Bailey KR, Saito Y, et al. Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension*. 1996; **28**(6): 988-94.
38. Clerico A, Iervasi G, Del Chicca MG, Emdin M, Maffei S, Nannipieri M, et al. Circulating levels of cardiac natriuretic peptides (ANP and BNP) measured by highly sensitive and specific immunoradiometric assays in normal subjects and in patients with different degrees of heart failure. *J Endocrinol Invest*. 1998; **21**(3): 170-9.
39. Horio T, Tokudome T, Maki T, Yoshihara F, Suga S, Nishikimi T, et al. Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Endocrinology*. 2003; **144**(6): 2279-84.
40. Wei CM, Heublein DM, Perrella MA, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, et al. Natriuretic peptide system in human heart failure. *Circulation*. 1993; **88**(3): 1004-9.
41. Del Ry S, Passino C, Emdin M, Giannessi D. C-type natriuretic peptide and heart failure. *Pharmacol Res*. 2006; **54**(5): 326-33.

42. Barr CS, Rhodes P, Struthers AD. C-type natriuretic peptide. *Peptides*. 1996; **17**(7): 1243-51.
43. Igaki T, Itoh H, Suga SI, Hama N, Ogawa Y, Komatsu Y, et al. Effects of intravenously administered C-type natriuretic peptide in humans: comparison with atrial natriuretic peptide. *Hypertens Res*. 1998; **21**(1): 7-13.
44. Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *The Journal of biological chemistry*. 1992; **267**(20): 13928-32.
45. Jamieson J, Palade G. Specific granules in atrial muscle cells. *The Journal of cell biology*. 1964; **23**(1): 151-72.
46. Oyama MA, Singletary GE. The use of NT-proBNP assay in the management of canine patients with heart disease. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2010; **40**(4): 545-58.
47. Sawada Y, Suda M, Yokoyama H, Kanda T, Sakamaki T, Tanaka S, et al. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *The Journal of biological chemistry*. 1997; **272**(33): 20545-54.
48. Oyama MA, Fox PR, Rush JE, Rozanski EA, Lesser M. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2008; **232**(10): 1496-503.
49. Wu AH, Smith A, Apple FS. Optimum blood collection intervals for B-type natriuretic peptide testing in patients with heart failure. *The American journal of cardiology*. 2004; **93**(12): 1562-3.
50. Wu AH, Smith A. Biological variation of the natriuretic peptides and their role in monitoring patients with heart failure. *European journal of heart failure*. 2004; **6**(3): 355-8.
51. Yandle TG. Biochemistry of natriuretic peptides. *Journal of internal medicine*. 1994; **235**(6): 561-76.
52. Sisson D. The diagnostic potential of natriuretic peptides in heart failure. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2000; **2**(1): 5-6.
53. Morrison LK, Harrison A, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Maisel A. Utility of a rapid B-natriuretic peptide assay in differentiating congestive heart failure from lung disease in patients presenting with dyspnea. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002; **39**(2): 202-9.
54. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *The New England journal of medicine*. 2002; **347**(3): 161-7.
55. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Suresh V, Poole-Wilson PA, et al. Survival of patients with a new diagnosis of heart failure: a population based study. *Heart (British Cardiac Society)*. 2000; **83**(5): 505-10.
56. Wuerz RC, Meador SA. Effects of prehospital medications on mortality and length of stay in congestive heart failure. *Ann Emerg Med*. 1992; **21**(6): 669-74.
57. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005; **112**(12): e154-235.
58. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *European heart journal*. 2005; **26**(11): 1115-40.
59. Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clinical chemistry*. 2004; **50**(1): 33-50.

60. Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006; **290**(1): H17-29.
61. Richards M, Nicholls MG, Espiner EA, Lainchbury JG, Troughton RW, Elliott J, et al. Comparison of B-type natriuretic peptides for assessment of cardiac function and prognosis in stable ischemic heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006; **47**(1): 52-60.
62. van Kimmenade RR, Januzzi JL. The evolution of the natriuretic peptides—Current applications in human and animal medicine. *Journal of Veterinary Cardiology*. 2009; **11**: S9-S21.
63. Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001; **38**(3): 789-95.
64. Das SR, Drazner MH, Dries DL, Vega GL, Stanek HG, Abdullah SM, et al. Impact of body mass and body composition on circulating levels of natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. *Circulation*. 2005; **112**(14): 2163-8.
65. Stevenson LW, Nohria A, Mielniczuk L. Torrent or torment from the tubules? Challenge of the cardiorenal connections. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005; **45**(12): 2004-7.
66. Steinhart B, Thorpe KE, Bayoumi AM, Moe G, Januzzi JL, Jr., Mazer CD. Improving the diagnosis of acute heart failure using a validated prediction model. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009; **54**(16): 1515-21.
67. Mueller C, Laule-Kilian K, Scholer A, Frana B, Rodriguez D, Schindler C, et al. Use of B-type natriuretic peptide for the management of women with dyspnea. *The American journal of cardiology*. 2004; **94**(12): 1510-4.
68. Januzzi JL, Jr., Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG, et al. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. *The American journal of cardiology*. 2005; **95**(8): 948-54.
69. Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, Bayes-Genis A, Ordonez-Llanos J, Santalo-Bel M, et al. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study. *European heart journal*. 2006; **27**(3): 330-7.
70. Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, Glasziou P. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *Bmj*. 2005; **330**(7492): 625.
71. O'Hanlon R, O'Shea P, Ledwidge M, O'Loughlin C, Lange S, Conlon C, et al. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *Journal of cardiac failure*. 2007; **13**(1): 50-5.
72. Pizarro R, Bazzino OO, Oberti PF, Falconi M, Achilli F, Arias A, et al. Prospective validation of the prognostic usefulness of brain natriuretic peptide in asymptomatic patients with chronic severe mitral regurgitation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009; **54**(12): 1099-106.
73. Schmidt MK, Reynolds CA, Estrada AH, Prosek R, Maisenbacher HW, Sleeper MM, et al. Effect of azotemia on serum N-terminal proBNP concentration in dogs with normal cardiac function: a pilot study. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2009; **11 Suppl 1**: S81-6.
74. Raffan E, Loureiro J, Dukes-McEwan J, Fonfara S, James R, Swift S, et al. The cardiac biomarker NT-proBNP is increased in dogs with azotemia. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2009; **23**(6): 1184-9.
75. Oyama MA, Rush JE, Rozanski EA, Fox PR, Reynolds CA, Gordon SG, et al. Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2009; **235**(11): 1319-25.
76. Atkinson KJ, Fine DM, Thombs LA, Gorelick JJ, Durham HE. Evaluation of pimobendan and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in the treatment of pulmonary hypertension secondary to degenerative mitral valve disease in dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2009; **23**(6): 1190-6.

77. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008; **52**(19): 1527-39.
78. Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. *American journal of veterinary research*. 2007; **68**(1): 42-7.
79. Mair J. Biochemistry of B-type natriuretic peptide—where are we now? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2008; **46**(11): 1507-14.
80. Kellihan HB, Oyama MA, Reynolds CA, Stepien RL. Weekly variability of plasma and serum NT-proBNP measurements in normal dogs. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2009; **11 Suppl 1**: S93-7.
81. O'Hanlon R, O'Shea P, Ledwidge M, O'Loughlin C, Lange S, Conlon C, et al. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *Journal of cardiac failure*. 2007; **13**(1): 50-5.
82. Wu AH. Serial testing of B-type natriuretic peptide and NTpro-BNP for monitoring therapy of heart failure: the role of biologic variation in the interpretation of results. *American heart journal*. 2006; **152**(5): 828-34.
83. Fine DM, DeClue AE, Reiner CR. Evaluation of circulating amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2008; **232**(11): 1674-9.
84. Wess G, Butz V, Mahling M, Hartmann K. Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *American journal of veterinary research*. 2011; **72**(5): 642-9.
85. Singletary GE, Morris NA, Lynne O'Sullivan M, Gordon SG, Oyama MA. Prospective Evaluation of NT-proBNP Assay to Detect Occult Dilated Cardiomyopathy and Predict Survival in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2012; **26**(6): 1330-6.
86. Heidenreich PA, Gubens MA, Fonarow GC, Konstam MA, Stevenson LW, Shekelle PG. Cost-effectiveness of screening with B-type natriuretic peptide to identify patients with reduced left ventricular ejection fraction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004; **43**(6): 1019-26.
87. Tarnow I, Olsen LH, Kvarn C, Hoglund K, Moesgaard SG, Kamstrup TS, et al. Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *Veterinary journal*. 2009; **180**(2): 195-201.
88. Noszczyk-Nowak A. NT-pro-BNP and troponin I as predictors of mortality in dogs with heart failure. *Polish journal of veterinary sciences*. 2011; **14**(4): 551-6.
89. Rishniw M, Ljungvall I, Porciello F, Haggstrom J, Ohad DG. Sleeping respiratory rates in apparently healthy adult dogs. *Research in veterinary science*. 2012; **93**(2): 965-9.
90. Bertrand PP, Bertrand RL. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci*. 2010; **153**(1-2): 47-57.
91. Hornung J-P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2003; **26**(4): 331-43.
92. Boess FG, Martin IL. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology*. 1994; **33**(3-4): 275-317.
93. Chang AS, Chang SM, Starnes DM, Schroeter S, Bauman AL, Blakely RD. Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; **43**(1-2): 185-92.
94. Sasa M. [Function of monoamine neurotransmitter transporters]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2001; **59**(8): 1457-64.
95. Wallace JA. Monoamines in the early chick embryo: demonstration of serotonin synthesis and the regional distribution of serotonin-concentrating cells during morphogenesis. *Am J Anat*. 1982; **165**(3): 261-76.
96. Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci*. 2003; **4**(12): 1002-12.
97. Lauder JM, Tamir H, Sadler TW. Serotonin and morphogenesis. I. Sites of serotonin uptake and -binding protein immunoreactivity in the midgestation mouse embryo. *Development*. 1988; **102**(4): 709-20.

98. Narboux-Neme N, Pavone LM, Avallone L, Zhuang X, Gaspar P. Serotonin transporter transgenic (SERT^{cre}) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). *Neuropharmacology*. 2008; **55**(6): 994-1005.
99. Buczek W. [Serotonin--blood platelets, vessels]. *Acta Haematol Pol*. 1994; **25**(2 Suppl 2): 61-5.
100. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther*. 2008; **31**(3): 187-99.
101. Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, et al. Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *J Neurosci*. 2008; **28**(10): 2495-505.
102. Nebigil CG, Maroteaux L. A novel role for serotonin in heart. *Trends Cardiovasc Med*. 2001; **11**(8): 329-35.
103. Sodersten P, Bergh C. Serotonin transporter binding in eating disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008; **197**(3): 519-20; author reply 21-2.
104. Nordquist N, Orelund L. Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders--a review. *Ups J Med Sci*. 2010; **115**(1): 2-10.
105. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999; **38**(8): 1083-152.
106. Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L. 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development*. 1997; **124**(9): 1745-55.
107. Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv*. 2004; **4**(2): 109-23.
108. Hansson SR, Cabrera-Vera TM, Hoffman BJ. Infraorbital nerve transection alters serotonin transporter expression in sensory pathways in early postnatal rat development. *Brain Res Dev Brain Res*. 1998; **111**(2): 305-14.
109. Murphy DL, Lesch KP. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nat Rev Neurosci*. 2008; **9**(2): 85-96.
110. Kuzelova H, Ptacek R, Macek M. The serotonin transporter gene (5-HTT) variant and psychiatric disorders: review of current literature. *Neuro Endocrinol Lett*. 2010; **31**(1): 4-10.
111. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007; **132**(1): 397-414.
112. Pavone LM, Spina A, Rea S, Santoro D, Mastellone V, Lombardi P, et al. Serotonin transporter gene deficiency is associated with sudden death of newborn mice through activation of TGF-beta1 signalling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009; **47**(5): 691-7.
113. Schloss P, Williams DC. The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. *J Psychopharmacol*. 1998; **12**(2): 115-21.
114. Rothman RB, Baumann MH. Therapeutic and adverse actions of serotonin transporter substrates. *Pharmacol Ther*. 2002; **95**(1): 73-88.
115. Yavarone MS, Shuey DL, Tamir H, Sadler TW, Lauder JM. Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology*. 1993; **47**(6): 573-84.
116. Frishman WH, Grewall P. Serotonin and the heart. *Annals of medicine*. 2000; **32**(3): 195-209.
117. Cote F, Fligny C, Fromes Y, Mallet J, Vodjdani G. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol Med*. 2004; **10**(5): 232-8.
118. Ni W, Watts SW. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2006; **33**(7): 575-83.
119. Wichman CL, Moore KM, Lang TR, St Sauver JL, Heise RH, Jr., Watson WJ. Congenital heart disease associated with selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy. *Mayo Clinic proceedings*. 2009; **84**(1): 23-7.
120. Fahim I, Robson JM, Senior JB. The 5-hydroxytryptamine content of the placenta, foetus and some maternal tissues during pregnancy in the rat. *Br J Pharmacol Chemother*. 1966; **26**(1): 237-47.
121. Gershon MD, Dreyfus CF, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. Serotonergic neurons in the peripheral nervous system: identification in gut by immunohistochemical localization of tryptophan

- hydroxylase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977; **74**(7): 3086-9.
- 122.Lidov HG, Molliver ME. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. Brain Res Bull. 1982; **9**(1-6): 559-604.
- 123.Sari Y, Zhou FC. Serotonin and its transporter on proliferation of fetal heart cells. Int J Dev Neurosci. 2003; **21**(8): 417-24.
- 124.Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, et al. Serotonin 2B receptor is required for heart development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000; **97**(17): 9508-13.
- 125.Rajamannan NM, Caplice N, Anthikad F, Sebo TJ, Orszulak TA, Edwards WD, et al. Cell proliferation in carcinoid valve disease: a mechanism for serotonin effects. The Journal of heart valve disease. 2001; **10**(6): 827-31.
- 126.Dubnov-Raz G, Juurlink DN, Fogelman R, Merlob P, Ito S, Koren G, et al. Antenatal use of selective serotonin-reuptake inhibitors and QT interval prolongation in newborns. Pediatrics. 2008; **122**(3): e710-5.
- 127.Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, Hensrud DD, Edwards BS, Edwards WD, et al. Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. The New England journal of medicine. 1997; **337**(9): 581-8.
- 128.Moller JE, Connolly HM, Rubin J, Seward JB, Modesto K, Pellikka PA. Factors associated with progression of carcinoid heart disease. The New England journal of medicine. 2003; **348**(11): 1005-15.
- 129.Pavone LM, Mithbaekar P, Mastellone V, Avallone L, Gaspar P, Maharajan V, et al. Fate map of serotonin transporter-expressing cells in developing mouse heart. Genesis. 2007; **45**(11): 689-95.
- 130.Mekontso-Dessap A, Brouri F, Pascal O, Lechat P, Hanoun N, Lanfumey L, et al. Deficiency of the 5-hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis and valvulopathy in mice. Circulation. 2006; **113**(1): 81-9.
- 131.Grewal JS, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Raymond JR, Greene EL. Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF-beta1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. The American journal of physiology. 1999; **276**(6 Pt 2): F922-30.
- 132.Gustafsson BI, Tommeras K, Nordrum I, Loennechen JP, Brunsvik A, Solligard E, et al. Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. Circulation. 2005; **111**(12): 1517-22.
- 133.Jian B, Xu J, Connolly J, Savani RC, Narula N, Liang B, et al. Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. The American journal of pathology. 2002; **161**(6): 2111-21.
- 134.Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, et al. Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. The American journal of pathology. 2002; **161**(6): 2209-18.
- 135.Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. Immunology. 2006; **118**(1): 10-24.
- 136.Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. Genes Dev. 2005; **19**(23): 2783-810.
- 137.Euler-Taimor G, Heger J. The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. Cardiovascular research. 2006; **69**(1): 15-25.
- 138.Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER, 3rd, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. The Annals of thoracic surgery. 2003; **75**(2): 457-65; discussion 65-6.
- 139.Olsen L HJ, Petersen H. Acquired Valvular Heart Disease. In: Ettinger SJ, editor. Textbook of veterinary internal medicine - Diseases of the dog and cat. Seventh ed. St. Louis - Missouri; 2010.
- 140.Kittleson M KR. Myxomatous Atrioventricular Valvular Degeneration. In: Kittleson MD, editor. Small Animal Cardiovascular Medicine: Mosby; 1998.
- 141.Haggstrom J, Hansson K, Kvart C, Swenson L. Chronic valvular disease in the cavalier King Charles spaniel in Sweden. The Veterinary record. 1992; **131**(24): 549-53.

- 142.Hamlin RL. Geriatric Heart Diseases in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2005; **35**(3): 597-615.
- 143.Hansson K, Haggstrom J, Kwart C, Lord P. Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Vet Radiol Ultrasound*. 2002; **43**(6): 568-75.
- 144.Hayek E, Gring CN, Griffin BP. Mitral valve prolapse. *The Lancet*. 2005; **365**(9458): 507-18.
- 145.Swenson L, Haggstrom J, Kwart C, Juneja RK. Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1996; **208**(12): 2009-12.
- 146.Borgarelli M, Haggstrom J. Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: natural history, clinical presentation and therapy. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2010; **40**(4): 651-63.
- 147.Haggstrom J. Acquired valvular heart disease. In: Saunders E, editor. *Textbook of Veterinary Internal Medicine Diseases of Dogs and Cats*. Philadelphia, PA, USA; 2005. p. 1022 – 40.
- 148.Santilli R BC, Borgarelli M. *Manuale di cardiologia del cane e del gatto*. Milano: Elsevier; 2012.
- 149.Sisson D. Acquired valvular heart disease in dogs and cats. In: Fox P, editor. *Textbook of canine and feline cardiology*. 2nd ed. Philadelphia: W B Saunders Co 1999. p. 536 – 65.
- 150.Pedersen HD, Kristensen B, Norby B, Lorentzen KA. Echocardiographic study of mitral valve prolapse in dachshunds. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe A*. 1996; **43**(2): 103-10.
- 151.Borgarelli M SP, Crosara S, Santilli A, Chiavegato D, Poggi M, Bellino C, La Rosa G, Zanatta R, Häggstrom J, Tarducci A. Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2008; (22): 120-8.
- 152.Olsen LH, Fredholm M, Pedersen HD. Epidemiology and inheritance of mitral valve prolapse in Dachshunds. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 1999; **13**(5): 448-56.
- 153.Olsen L, Martinussen T, Pedersen H. Early echocardiographic predictors of myxomatous mitral valve disease in dachshunds. *The Veterinary record*. 2003; **152**(10): 293-7.
- 154.Savarino P, Borgarelli M, Tarducci A, Crosara S, Bello NM, Margiocco ML. Diagnostic performance of P wave duration in the identification of left atrial enlargement in dogs. *The Journal of small animal practice*. 2012; **53**(5): 267-72.
- 155.Lewis T, Swift S, Woolliams JA, Blott S. Heritability of premature mitral valve disease in Cavalier King Charles spaniels. *Veterinary journal*. 2011; **188**(1): 73-6.
- 156.Pedersen HD, Haggstrom J. Mitral valve prolapse in the dog: a model of mitral valve prolapse in man. *Cardiovascular research*. 2000; **47**(2): 234-43.
- 157.Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Schoen FJ. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation*. 2001; **104**(21): 2525-32.
- 158.Disatian S. Myxomatous degenerative mitral valve disease: An update. *Thai J Vet Med*. 2010; **40**(2): 151-7.
- 159.PS M. *Patologia sistematica veterinaria*. Milano: Edagricole; 2008.
- 160.Bigg PW, Baldo G, Sleeper MM, O'Donnell PA, Bai H, Rokkam VR, et al. Pathogenesis of mitral valve disease in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Mol Genet Metab*. 2013; **110**(3): 319-28.
- 161.Disatian S, Ehrhart EJ, 3rd, Zimmerman S, Orton EC. Interstitial cells from dogs with naturally occurring myxomatous mitral valve disease undergo phenotype transformation. *The Journal of heart valve disease*. 2008; **17**(4): 402-11; discussion 12.
- 162.Oyama MA, Chittur SV. Genomic expression patterns of mitral valve tissues from dogs with degenerative mitral valve disease. *American journal of veterinary research*. 2006; **67**(8): 1307-18.
- 163.Arndt JW, Reynolds CA, Singletary GE, Connolly JM, Levy RJ, Oyama MA. Serum serotonin concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2009; **23**(6): 1208-13.

- 164.Oyama MA, Levy RJ. Insights into serotonin signaling mechanisms associated with canine degenerative mitral valve disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2010; **24**(1): 27-36.
- 165.Aupperle H, Marz I, Thielebein J, Schoon HA. Expression of transforming growth factor-beta1, -beta2 and -beta3 in normal and diseased canine mitral valves. *Journal of comparative pathology*. 2008; **139**(2-3): 97-107.
- 166.Mow T, Pedersen HD. Increased endothelin-receptor density in myxomatous canine mitral valve leaflets. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1999; **34**(2): 254-60.
- 167.Borgarelli M, Tursi M, La Rosa G, Savarino P, Galloni M. Anatomic, histologic, and two-dimensional-echocardiographic evaluation of mitral valve anatomy in dogs. *American journal of veterinary research*. 2011; **72**(9): 1186-92.
- 168.Angelini A. Anatomy of mitral valve. In: CF BHW, editor. *Mitral Valve: Floppy Mitral Valve, Mitral Valve Prolapse and Mitral Valvular Regurgitation*. 2nd ed. New York: Armonk Inc; 2000. p. 5 – 29.
- 169.J. A. Acquired valvular disease. In: Tilley L SFJ, Oyama M, Sleeper M, editor. *Manual of Canine and Feline Cardiology*. Fourth ed. St Louis –Missouri: Saunders Elsevier; 2008.
- 170.Borgarelli M, Zini E, D'Agnolo G, Tarducci A, Santilli RA, Chiavegato D, et al. Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2004; **6**(2): 27-34.
- 171.Whitney JC. Observations on the effect of age on the severity of heart valve lesions in the dog. *The Journal of small animal practice*. 1974; **15**(8): 511-22.
- 172.Triposkiadis F, Tentolouris K, Androulakis A, Trikas A, Toutouzas K, Kyriakidis M, et al. Left atrial mechanical function in the healthy elderly: new insights from a combined assessment of changes in atrial volume and transmitral flow velocity. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 1995; **8**(6): 801-9.
- 173.Moonarmart W. *Studies on the natural history and progression of acquired mitral valve insufficiency in the dog*. London, UK: London University; 2008.
- 174.Triposkiadis F. Left atrial mechanical function in the healthy elderly: new insights from a combined assessment of changes in atrial volume and transmitral flow velocity. *Journal of American Society of Echocardiography*. 1995; **8**: 801 – 9.
- 175.Culshaw GJ, French AT, Han RI, Black A, Pearson GT, Corcoran BM. Evaluation of innervation of the mitral valves and the effects of myxomatous degeneration in dogs. *American journal of veterinary research*. 2010; **71**(2): 194-202.
- 176.Sisson D. Pathophysiology of heart failure. In: Ettinger SJ FE, editor. *Textbook of veterinary internal medicine - Diseases of the dog and cat*. Seventh ed. St. Louis - Missouri: Saunders Elsevier; 2010.
- 177.Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *Journal of veterinary internal medicine*. 2009; **23**(6): 1142-50.
- 178.WA W. *Patologie valvolari acquisite. Malattie dell'apparato cardiovascolare – Cane e Gatto*. Scienze Medice-Torino: UTET; 2007.
- 179.J. B. *Acquired Valvular Disease. Boon Veterinary Echocardiography*. Second ed: Wiley- Blackwell 2011.
- 180.Khoo CW, Krishnamoorthy S, Lim HS, Lip GY. Assessment of left atrial volume: a focus on echocardiographic methods and clinical implications. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2011; **100**(2): 97-105.
- 181.Terzo E, Di Marcello M, McAllister H, Glazier B, Lo Coco D, Locatelli C, et al. Echocardiographic assessment of 537 dogs with mitral valve prolapse and leaflet involvement. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009; **50**(4): 416-22.
- 182.Ettinger SJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. In: Ettinger SJ FE, editor. *Textbook of veterinary internal medicine - Diseases of the dog and cat*. Seventh ed. St. Louis - Missouri: Saunders Elsevier; 2010.
- 183.Kvart C, Haggstrom J, Pedersen HD, Hansson K, Eriksson A, Jarvinen AK, et al. Efficacy of enalapril for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic

- mitral regurgitation. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2002; **16**(1): 80-8.
184. Atkins CE, Keene BW, Brown WA, Coats JR, Crawford MA, DeFrancesco TC, et al. Results of the veterinary enalapril trial to prove reduction in onset of heart failure in dogs chronically treated with enalapril alone for compensated, naturally occurring mitral valve insufficiency. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2007; **231**(7): 1061-9.
185. Pouchelon JL, Jamet N, Gouni V, Tissier R, Serres F, Carlos Sampedrano C, et al. Effect of benazepril on survival and cardiac events in dogs with asymptomatic mitral valve disease: a retrospective study of 141 cases. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2008; **22**(4): 905-14.
186. Ljungvall I, Hoglund K, Tidholm A, Olsen LH, Borgarelli M, Venge P, et al. Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2010; **24**(1): 153-9.
187. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of clinical investigation*. 1975; **56**(1): 56-64.
188. van der Laarse A. Hypothesis: troponin degradation is one of the factors responsible for deterioration of left ventricular function in heart failure. *Cardiovascular research*. 2002; **56**(1): 8-14.
189. Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2004; **18**(6): 831-9.
190. Venge P, Johnston N, Lagerqvist B, Wallentin L, Lindahl B. Clinical and analytical performance of the liaison cardiac troponin I assay in unstable coronary artery disease, and the impact of age on the definition of reference limits. A FRISC-II substudy. *Clinical chemistry*. 2003; **49**(6 Pt 1): 880-6.
191. Spratt DP, Mellanby RJ, Drury N, Archer J. Cardiac troponin I: evaluation I of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *The Journal of small animal practice*. 2005; **46**(3): 139-45.
192. Jaffe AS, Landt Y, Parvin CA, Abendschein DR, Geltman EM, Ladenson JH. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clinical chemistry*. 1996; **42**(11): 1770-6.
193. DeFrancesco TC, Atkins CE, Keene BW, Coats JR, Hauck ML. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin T in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. *Journal of veterinary internal medicine*. 2002; **16**(5): 553-7.
194. Wu AH, Fukushima N, Puskas R, Todd J, Goix P. Development and preliminary clinical validation of a high sensitivity assay for cardiac troponin using a capillary flow (single molecule) fluorescence detector. *Clinical chemistry*. 2006; **52**(11): 2157-9.
195. Dean KJ. *Biochemistry and molecular biology of troponins I and T*. Cardiac markers: Springer; 1998. p. 193-204.
196. Adin DB, Milner RJ, Berger KD, Engel C, Salute M. Cardiac troponin I concentrations in normal dogs and cats using a bedside analyzer. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2005; **7**(1): 27-32.
197. Whitney JC. Some aspects of the pathogenesis of canine arteriosclerosis. *The Journal of small animal practice*. 1976; **17**(2): 87-97.
198. Jonsson L. Coronary arterial lesions and myocardial infarcts in the dog. A pathologic and microangiographic study. *Acta Vet Scand Suppl*. 1972; **38**: 1-80.
199. Detweiler DK, Patterson DF. The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1965; **127**(1): 481-516.
200. Linklater AK, Lichtenberger MK, Thamm DH, Tilley L, Kirby R. Serum concentrations of cardiac troponin I and cardiac troponin T in dogs with class IV congestive heart failure due to mitral valve disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2007; **17**(3): 243-9.
201. Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. N-terminal pro brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002; **40**(3): 437-45.
202. Hezzell MJ, Boswood A, Chang YM, Moonarmart W, Souttar K, Elliott J. The combined prognostic potential of serum high-sensitivity cardiac troponin I and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide

- concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2012; **26**(2): 302-11.
203. Moonarmart W, Boswood A, Luis Fuentes V, Brodbelt D, Souttar K, Elliott J. N-terminal pro B-type natriuretic peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *The Journal of small animal practice*. 2010; **51**(2): 84-96.
204. Lloyd-Jones DM, Hong Y, Labarthe D, Mozaffarian D, Appel LJ, Van Horn L, et al. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. *Circulation*. 2010; **121**(4): 586-613.
205. Gow DJ, Gow AG, Bell R, Spratt D, Cash R, Ricketts S, et al. Serum cardiac troponin I in dogs with primary immune-mediated haemolytic anaemia. *The Journal of small animal practice*. 2011; **52**(5): 259-64.
206. Schober KE, Cornand C, Kirbach B, Aupperle H, Oechtering G. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2002; **221**(3): 381-8.
207. Hagman R, Lagerstedt AS, Fransson BA, Bergstrom A, Haggstrom J. Cardiac troponin I levels in canine pyometra. *Acta veterinaria Scandinavica*. 2007; **49**: 6.
208. Gow DJ, Gow AG, Bell R, Spratt D, Cash R, Ricketts S, et al. Serum cardiac troponin I in dogs with primary immune-mediated haemolytic anaemia. *The Journal of small animal practice*. 2011; **52**(5): 259-64.
209. Chetboul V, Serres F, Tissier R, Lefebvre HP, Sampedrano CC, Gouni V, et al. Association of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration with mitral regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative mitral valve disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2009; **23**(5): 984-94.
210. Moesgaard SG, Falk T, Teerlink T, Guethmundsdottir HH, Sigurethardottir S, Rasmussen CE, et al. Brain-natriuretic peptide and cyclic guanosine monophosphate as biomarkers of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 2011; **189**(3): 349-52.
211. MacDonald KA, Kittleson MD, Munro C, Kass P. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2003; **17**(2): 172-7.
212. Research Abstract Program of the 26th Annual ACVIM Forum San Antonio, TX, June 4 – June 7, 2008. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008; **22**(3): 687-824.
213. Serres F, Pouchelon JL, Poujol L, Lefebvre HP, Trumel C, Daste T, et al. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2009; **11**(2): 103-21.
214. Group BS. The effect of benazepril on survival times and clinical signs of dogs with congestive heart failure: Results of a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled, long-term clinical trial. *Journal of Veterinary Cardiology*. 1999; **1**(1): 7-18.
215. Ettinger SJ, Benitz AM, Ericsson GF, Cifelli S, Jernigan AD, Longhofer SL, et al. Effects of enalapril maleate on survival of dogs with naturally acquired heart failure. The Long-Term Investigation of Veterinary Enalapril (LIVE) Study Group. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1998; **213**(11): 1573-7.
216. Lombard CW, Jons O, Bussadori CM. Clinical efficacy of pimobendan versus benazepril for the treatment of acquired atrioventricular valvular disease in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2006; **42**(4): 249-61.
217. Haggstrom J, Boswood A, O'Grady M, Jons O, Smith S, Swift S, et al. Effect of pimobendan or benazepril hydrochloride on survival times in dogs with congestive heart failure caused by naturally occurring myxomatous mitral valve disease: the QUEST study. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2008; **22**(5): 1124-35.
218. Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, Santilli RA, Chiavegato D, Poggi M, et al. Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous

- valve disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2008; **22**(1): 120-8.
219. Wolf J, Gerlach N, Weber K, Klima A, Wess G. Lowered N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in response to treatment predict survival in dogs with symptomatic mitral valve disease. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2012; **14**(3): 399-408.
220. lung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol*. 2011; **8**(3): 162-72.
221. Buchanan JW. Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs. *Adv Vet Sci Comp Med*. 1977; **21**: 75-106.
222. Davies MJ, Moore BP, Braimbridge MV. The floppy mitral valve. Study of incidence, pathology, and complications in surgical, necropsy, and forensic material. *British heart journal*. 1978; **40**(5): 468-81.
223. Gupta V, Barzilla JE, Mendez JS, Stephens EH, Lee EL, Collard CD, et al. Abundance and location of proteoglycans and hyaluronan within normal and myxomatous mitral valves. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2009; **18**(4): 191-7.
224. Connolly JM, Bakay MA, Fulmer JT, Gorman RC, Gorman JH, 3rd, Oyama MA, et al. Fenfluramine disrupts the mitral valve interstitial cell response to serotonin. *The American journal of pathology*. 2009; **175**(3): 988-97.
225. Disatian S, Orton EC. Autocrine serotonin and transforming growth factor beta 1 signaling mediates spontaneous myxomatous mitral valve disease. *The Journal of heart valve disease*. 2009; **18**(1): 44-51.
226. Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H. Effects of transforming growth factor-beta3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. *American journal of veterinary research*. 2011; **72**(2): 194-202.
227. Donnelly KB. Cardiac valvular pathology: comparative pathology and animal models of acquired cardiac valvular diseases. *Toxicologic pathology*. 2008; **36**(2): 204-17.
228. Arndt JW, Reynolds CA, Singletary GE, Connolly JM, Levy RJ, Oyama MA. Serum serotonin concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2009; **23**(6): 1208-13.
229. Lacerda CM, Maclea HB, Kisiday JD, Orton EC. Static and cyclic tensile strain induce myxomatous effector proteins and serotonin in canine mitral valves. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2012; **14**(1): 223-30.
230. Ljungvall I, Hoglund K, Lilliehook I, Oyama MA, Tidholm A, Tvedten H, et al. Serum serotonin concentration is associated with severity of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2013; **27**(5): 1105-12.
231. Mangklabruks T, Surachetpong SD. Plasma and platelet serotonin concentrations in healthy dogs and dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2014; **16**(3): 155-62.
232. Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *The American journal of physiology*. 1982; **243**(3): R454-61.
233. Thomas CJ, Woods RL. Haemodynamic action of B-type natriuretic peptide substantially outlasts its plasma half-life in conscious dogs. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2003; **30**(5-6): 369-75.
234. Boswood A, Duker-McEwan J, Loureiro J, James RA, Martin M, Stafford-Johnson M, et al. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *The Journal of small animal practice*. 2008; **49**(1): 26-32.
235. IDEXX Laboratories. Il nuovo test Idexx Cardiopet proBNP. 2010 [cited 2015 01.2015]; Available from: http://www.idexx.it/pdf/it_it/smallanimal/reference-laboratories/cardiopet-probnp.pdf
236. Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac

- troponin-I. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2007; **21**(2): 238-42.
237. Tsutamoto T, Kawahara C, Nishiyama K, Yamaji M, Fujii M, Yamamoto T, et al. Prognostic role of highly sensitive cardiac troponin I in patients with systolic heart failure. *American heart journal*. 2010; **159**(1): 63-7.
238. Oyama MA. Neurohormonal activation in canine degenerative mitral valve disease: implications on pathophysiology and treatment. *The Journal of small animal practice*. 2009; **50 Suppl 1**: 3-11.
239. Sisson D. B-type natriuretic peptides. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2009; **11 Suppl 1**: S5-7.
240. Misbach C, Chetboul V, Concordet D, Gruet P, Speranza C, Hoffmann AC, et al. Basal plasma concentrations of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in clinically healthy adult small size dogs: effect of body weight, age, gender and breed, and reference intervals. *Research in veterinary science*. 2013; **95**(3): 879-85.
241. Wolf J, Gerlach N, Weber K, Klima A, Wess G. The diagnostic relevance of NT-proBNP and proANP 31-67 measurements in staging of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*. 2013; **42**(2): 196-206.
242. Ettinger SJ, Farace G, Forney SD, Frye M, Beardow A. Evaluation of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in dogs with and without cardiac disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012; **240**(2): 171-80.
243. Oyama MA, Fox PR, Rush JE, Rozanski EA, Lesser M. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2008; **232**(10): 1496-503.
244. Achen SE. Serial evaluation of NT-proBNP in dogs with CHF predicts clinical score and the presence or absence of radiographic pulmonary edema. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2009; (23): 687.
245. Trafny DJ, Freeman LM, Bulmer BJ, MacGregor JM, Rush JE, Meurs KM, et al. Auscultatory, echocardiographic, biochemical, nutritional, and environmental characteristics of mitral valve disease in Norfolk terriers. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. 2012; **14**(1): 261-7.
246. Latini R, Masson S, Anand IS, Missov E, Carlson M, Vago T, et al. Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure. *Circulation*. 2007; **116**(11): 1242-9.
247. Rehman SU, Mueller T, Januzzi JL, Jr. Characteristics of the novel interleukin family biomarker ST2 in patients with acute heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008; **52**(18): 1458-65.