



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di *BIOMEDICINA COMPARATA E ALIMENTAZIONE*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
VETERINARIE

INDIRIZZO COMUNE

CICLO XXVI

**AMPIEZZA DELLA DISTRIBUZIONE
ERITROCITARIA IN CANI CON IPERTENSIONE
POLMONARE**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. GIANFRANCO GABAI

Supervisore : Ch.mo Prof. GUGLIELMINI CARLO

Dottorando : Dott.ssa Elisa Mazzotta

INDICE

ABSTRACT.....	I
RIASSUNTO.....	II
1. INTRODUZIONE.....	1
2. <i>L'AMPIEZZA DELLA DISTRIBUZIONE ERITROCITARIA</i>	3
3. <i>IPERTENSIONE POLMONARE</i>	9
3.1. FISIOPATOLOGIA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE.....	10
3.2. CLASSIFICAZIONE CLINICA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE.....	12
3.3. GRUPPI DI CLASSIFICAZIONE CLINICA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE.....	14
3.4. CLASSIFICAZIONE EMODINAMICA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE.....	21
3.5. DIAGNOSI CLINICA DI IPERTENSIONE POLMONARE.....	23
I. PRESENTAZIONE CLINICA.....	23
II. ELETTROCARDIOGRAMMA.....	24
III. RADIOGRAFIE DEL TORACE.....	24
IV. ECOCARDIOGRAFIA.....	25
V. DIAGNOSI LABORATORISTICA: MARKER BIOCHIMICI.....	28
VI. CATETERISMO DEL CUORE DESTRO.....	32
VII. ALTRI STRUMENTI DIAGNOSTICI.....	32
3.6. TERAPIA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE.....	33
I. TRATTAMENTO DELL'IPERTENSIONE POLMONARE PRE-CAPILLARE.....	33
II. TRATTAMENTO DELL'IPERTENSIONE POLMONARE POST-CAPILLARE.....	36
III. TERAPIE DI SUPPORTO.....	37
4. <i>CONTRIBUTO SPERIMENTALE</i>	39
4.1. SCOPO DEL LAVORO.....	39
4.2. MATERIALI E METODI.....	40
I. POPOLAZIONE.....	40
II. VALUTAZIONE ECOCARDIOGRAFICA ED ECO-DOPLER.....	43
III. VALUTAZIONE LABORATORISTICA.....	45
IV. ANALISI STATISTICA.....	47
4.3. RISULTATI.....	49
I. STUDIO DI POPOLAZIONE.....	49
II. VARIABILI LABORATORISTICHE ED ECOCARDIOGRAFICHE.....	51
III. RDW.....	53
4.4. DISCUSSIONE.....	59
4.5. CONCLUSIONE.....	65
5. <i>BIBLIOGRAFIA</i>	67

ABSTRACT

Red blood cell distribution width (RDW) is a quantitative measurement of anisocytosis. This haematological parameter is an important prognostic biomarker for different cardiovascular and thrombotic disorders in humans but has been poorly investigated in dogs with cardiovascular disorders. The RDW and various complete blood count and serum biochemical variables were prospectively investigated in 157 client-owned dogs, including 39 healthy dogs, 94 dogs with chronic degenerative valvular disease (CDVD) with or without pulmonary hypertension (PH) and 24 dogs with pre-capillary PH. Correlations between RDW and various echocardiographic and laboratory variables were also investigated.

Median RDW in dogs with pre-capillary PH (14.0%; range, 11.3-22.4%) and dogs with CDVD, either with PH (13.5%, range 11.2-16.6%) or without PH (13.55%, range 11.7-17.6%) was significantly increased compared to that of healthy dogs (13.1%, range 11.8-14.5%; $P < 0.001$, $P < 0.05$ and $P < 0.05$, respectively).

The RDW had a significant, weak, positive correlation with white blood cell count (correlation coefficient = 0.282), urea concentration (correlation coefficient = 0.299) and Doppler-derived pulmonary artery systolic pressure (correlation coefficient = 0.238).

Results of the present study indicate that PH can play a role in the pathophysiology of anisocytosis and associated RDW levels and that RDW is correlated with PH severity in dogs.

RIASSUNTO

Il valore di RDW (*Red Blood Cell Distribution Width*) è un indice quantitativo di anisocitosi. Tale parametro ematologico in medicina umana è dimostrato essere un importante biomarker di diverse patologie cardiovascolari e tromboemboliche, ma risulta ancora essere poco indagato nel cane con patologie cardiovascolari. Il valore di RDW è stato indagato in questo studio prospettico in relazione a diversi parametri dell'esame emocromocitometrico e dell'esame biochimico, in 157 cani di proprietà. Tra i cani inclusi nello studio ritroviamo 39 cani sani, 94 cani con malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV) associata o meno ad ipertensione polmonare, e 24 cani con ipertensione polmonare pre-capillare. Sono state inoltre investigate le correlazioni tra il valore di RDW ed i parametri laboratoristici ed ecocardiografici.

La mediana del valore di RDW in cani con ipertensione polmonare pre-capillare (14.0%; range, 11.3-22.4%) ed i cani con MDCV non associata ad ipertensione polmonare (13.55%, range 11.7-17.6%) e associata ad ipertensione polmonare (13.5%, range 11.2-16.6%), era significativamente superiore rispetto ai cani sani (13.1%, range 11.8-14.5%; $P < 0.001$, $P < 0.05$ e $P < 0.05$, rispettivamente). Il valore di RDW è risultato positivamente e debolmente correlato con la conta dei globuli bianchi (WBC) (coefficiente di correlazione = 0.282), con la concentrazione plasmatica di urea (coefficiente di correlazione = 0.238) e con la pressione arteriosa sistolica polmonare ricavata dalle misurazioni eco-Doppler (coefficiente di correlazione = 0.238).

I risultati del presente studio indicano che l'ipertensione polmonare potrebbe essere coinvolta nel meccanismo fisiopatologico dell'anisocitosi essendo associata al valore di RDW, inoltre che il valore di RDW possa essere correlato alla gravità della condizione di ipertensione polmonare nel cane.

1. INTRODUZIONE

Il presente progetto di ricerca ha come obiettivo lo sviluppo dell'ipotesi che l'ampiezza della distribuzione eritrocitaria (dall'inglese *Red Blood Cells Distribution Width, RDW*) possa avere un significato clinico e diagnostico nella valutazione delle patologie cardiache ed extracardiache nel cane che generano una condizione di ipertensione polmonare.

L'ipertensione polmonare (IP) viene definita come una condizione clinica in cui la pressione sistolica e media misurata a livello della arteria polmonare tramite cateterismo cardiaco supera 30 e 20 mmHg, rispettivamente. Tale condizione è ampiamente studiata in medicina umana e viene considerata come il *gold standard test* per la diagnosi di ipertensione polmonare e la classificazione a seconda dell'eziopatogenesi in primaria o secondaria. In medicina veterinaria per la diagnosi di IP si preferisce utilizzare una procedura meno invasiva quale la valutazione ecocardiografica delle camere cardiache e dei vasi, lo studio dei flussi tramite metodica eco-Doppler e delle velocità dei rigurgiti valvolari.

Da un punto di vista sintomatologico i segni clinici ascrivibili ad una condizione di ipertensione polmonare sono simili a quelli riscontrabili in pazienti con insufficienza cardiaca: tosse, intolleranza all'esercizio, dispnea, sincope, edema sottocutaneo, ascite, cianosi delle mucose (Serres et al., 2006).

Come riportato in letteratura, la gravità della manifestazione dei sintomi è correlata allo stadio di progressione della patologia (Galiè et al., 2004).

Il valore di RDW è un parametro eritrocitario che identifica lo stato di anisocitosi della popolazione dei globuli rossi. (Evans e Jehle, 1991). In medicina umana è ampiamente riportato che la valutazione di tale parametro in pazienti critici che presentano ipertensione polmonare dovuta a cause cardiache ed extra cardiache, fornisce un'indicazione prognostica sia per la scelta dell'approccio terapeutico immediato che per la gestione a lungo termine di tali pazienti (Felker et al., 2007).

In medicina veterinaria lo studio di tale parametro è limitato alla valutazione e caratterizzazione delle anemie nel cane (Hodgens et al., 2011) ed è stato recentemente studiato dal nostro gruppo di lavoro in situazioni di cani con malattia degenerativa cronica valvolare con o senza insufficienza cardiaca (Guglielmini et al., 2013).

2. L'AMPIEZZA DELLA DISTRIBUZIONE ERITROCITARIA

L'ampiezza di distribuzione eritrocitaria (dall'inglese *Red Blood Cell Distribution Width*, *RDW*) è un parametro eritrocitario che esprime quantitativamente l'indice di anisocitosi dei globuli rossi (Felker et al., 2007). Tale parametro è routinariamente incluso nel esame emocromocitometrico utilizzando i più moderni contaglobuli, in cui compreso nella conta cellulare totale, vengono misurati e calcolati parametri ed indici che delineano le caratteristiche della popolazione eritrocitaria. La variazione del diametro degli eritrociti è un parametro associato al volume eritrocitario corpuscolare medio dei globuli rossi (MCV) e viene calcolata secondo la formula matematica (Evans e Jehle, 1991):

$$RDW = (\text{deviazione standard MCV} \div \text{MCV}) \times 100$$

Un globulo rosso ha come dimensioni standard un diametro compreso tra i 6 e gli 8 μm , ed uno spessore di 2 μm , con un volume risultante circa 90 fL ed un area di circa 136 μm^2 . L'intervallo del il valore di RDW considerato generalmente come riferimento è compreso tra 11-14 % ed è simile sia in medicina umana che in medicina veterinaria, riferito al cane.

Valori di RDW inferiori al limite minimo posso essere considerati clinicamente poco significativi, mentre valori di RDW superiori al limite massimo indicano che le dimensioni dei globuli rossi circolanti sono molto eterogenee tra loro e dunque risulta clinicamente significativo un aumento dell'anisocitosi.

Il valore di RDW viene associato al valore di MCV per la valutazione delle condizioni di anemia clinica e subclinica (Tonelli et al., 2008).

Nella pratica clinica in medicina veterinaria esso risulta essere utile nella discriminazione delle anemie rigenerative dalle anemie non rigenerative (Hodgens et al., 2011), in cui si dimostra che elevati valori di RDW associati a policromasia premettono di determinare la natura rigenerativa in una condizione di anemia, in particolare quando non è disponibile l'indice reticolocitario.

Nelle anemie emolitiche immunomediate (dall'inglese *Immune-Mediated Hemolytic Anemia*, IMHA), riportate essere per il 65% di origine primaria o idiopatica nel cane (Piek et al, 2008), si evidenziano, oltre all'aumento del valore di RDW, anche alterazioni della morfologia eritrocitaria come la sferocitosi e la stomatocitosi. Va ricordato che negli Alaskan Malamute, Schnauzer nani e medi, e Drentse Potrijshound, è presente una stomatocitosi di tipo ereditario che si manifesta con aumento del RDW in assenza di IMHA (Bonfanti et al, 2004).

In medicina umana il valore di RDW premette di discriminare in particolare anemie da carenza di ferro e vitamina B12 (RDW aumentato) dalla talassemia (RDW solitamente nei limiti della norma), da anemie megaloblastiche (RDW aumentato), da altre cause di macrocitosi in cui, con maggior probabilità, il valore di RDW viene riscontrato normale.

Un aumento del valore di RDW si riscontra in condizioni di inefficace produzione di globuli rossi (deficienza di ferro, vitamina B12 e folati, emoglobinopatie o degenerazione midollare, processi neoplastici a carico del midollo osseo o della popolazione cellulare ematica) (Montagnana et al., 2012), in situazioni di aumentata distruzione degli eritrociti (emolisi, mielopatie, micro o macroangiopatie) o in seguito ad emotrasfusioni (Rhodes et al., 2011).

Tra le più significative condizioni fisiopatologiche che prevedono l'associazione tra una condizione di anemia clinica o subclinica e le patologie cardiovascolari sono rappresentate dalla sindrome cardio-renale in cui i meccanismi di tipo non emodinamico vanno menzionati l'attivazione del sistema nervoso simpatico (SNS), quella del sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA) e la presenza di uno stato infiammatorio cronico.

Nei pazienti affetti da scompenso cardiaco, la diminuzione della volemia efficace e quella della gittata cardiaca determinano un'iperattivazione sia del SNS che del SRAA; il risultato finale è dato dall'ulteriore riduzione del flusso plasmatico renale e del filtrato glomerulare ed ad una diminuzione della secrezione di eritropoietina (EPO) (Braam et al., 2012). Le tipologie di anemia che si riscontrano prevalentemente in pazienti affetti da sindrome cardio-renale sono rappresentati da: anemia da emodiluizione, da deficienza di ferro, da

nefropatia cronica (ridotta secrezione di EPO, glomerulopatie, tubulo-interstiziopatie croniche) e nefropatia secondaria (vasculiti, diabete mellito, shock settico) (Ronco, 2010).

Un altro meccanismo fisiopatologico preso in considerazione è la ridotta perfusione ematica a livello intestinale con rilascio di elevate concentrazioni di endotossine batteriche ed, in particolare, di lipopolisaccaride delle pareti batteriche (Podolsky, 2002).

In ultima analisi vanno considerati i fattori iatrogeni ed, in particolare, le procedure terapeutiche che vengono utilizzate, ad esempio, nei pazienti diabetici, neoplastici o cardiopatici. La presenza di uno stato settico conduce all'attivazione del SRAA nel tentativo di mantenere adeguati livelli di pressione arteriosa sistemica, al rilascio di mediatori dell'infiammazione e di proteine di fase acuta con dimostrate alterazioni della funzionalità cardiaca e renale (Nanas et al., 2006).

Recentemente sono stati sviluppati degli studi che hanno aperto un nuovo scenario in cui il parametro RDW risulta essere un utile biomarker diagnostico e prognostico nelle patologie cardiache e vascolari in medicina umana (Förchéc et al., 2009).

L'aumento del valore di RDW si è dimostrato essere associato a elevato tasso di mortalità per cause cardiache e non cardiache in pazienti con patologie delle arterie coronarie (Tonelli et al., 2008), insufficienza cardiaca acuta e cronica (Jung et al., 2011), infarto miocardico (Ani et al., 2009), patologie tromboemboliche del circolo arterioso periferico (Ye et al., 2011), tromboembolismi polmonari (Zorlu et al., 2012) ed ipertensione arteriosa polmonare (Hampole et al., 2009), insufficienza renale acuta (Oh et al., 2009) e nella maggior parte delle circostanze indipendentemente dai valori di emoglobina (Hb) ed ematocrito (Htc). Dimostrata inoltre l'associazione del valore dei RDW ad un elevato tasso di mortalità in pazienti critici (Bazick et al., 2011).

In uno studio è stata riportata la correlazione esistente tra un elevato valore di RDW ed i parametri ecocardiografici, dimostrando che questo marker facilmente eseguibile risulta essere associato ad un aumento della pressione di riempimento ventricolare in pazienti con insufficienza cardiaca acuta (Oh et al., 2009).

Elevati valori di RDW al momento dell'ospedalizzazione di pazienti non anemici con insufficienza cardiaca acuta scompensata, sono dimostrati essere un indipendente fattore predittivo dell'insorgenza di diminuzione della concentrazione emoglobinica e dello sviluppo di una condizione di anemia durante i seguenti 6 mesi dal momento della dimissione (Pascual-Figal et al., 2009). Un recente studio eseguito da Georges et al. (2013), riporta che elevati valori di RDW sono predittivi di nuova ospedalizzazione in pazienti con angina instabile o infarto miocardico senza elevazione del tratto ST.

In uno studio recentemente pubblicato dal nostro gruppo di lavoro (Guglielmini et al., 2013) sono stati valutati i valori di RDW in cani affetti da malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV). I risultati riportano una bassa percentuale di cani anemici tra i pazienti con MDCV (8.1%) ed una correlazione negativa tra RDW, ematocrito e concentrazione emoglobinica, in grado di confermare l'associazione tra l'ampiezza di distribuzione eritrocitaria e l'anemia rigenerativa. I valori di RDW non si sono dimostrati correlati con gli indici ecocardiografici di ingrandimento atriale sinistro e di funzionalità cardiaca alterata all'interno del gruppo dei cani affetti da MDCV, da cui si evince che l'anisocitosi non rappresenta un meccanismo fisiopatologico primario nella malattia degenerativa valvolare cronica nel cane (Guglielmini et al., 2013).

Diversi studi hanno trattato del valore di RDW correlato a patologie vascolari e tromboemboliche in medicina umana.

Uno studio di Zalawadiya et al. (2010), dimostra come il valore di RDW possa essere un importante fattore predittivo indipendente per il rischio di insorgenza di patologie coronariche nella popolazione, nonché in un ulteriore studio si riporta come fattore di rischio dello sviluppo di eventi cardiovascolari in genere (Vayà et al., 2012).

In uno studio condotto da Sánchez-Chaparro et al. (2010), si è dimostrato come elevati valori di RDW siano correlati alla sindrome metabolica (dall'inglese *Metabolic Syndrome*, MetS). Tale processo patologico esprime uno stato infiammatorio cronico in cui si evidenzia esacerbazione di uno stato di stress ossidativo il quale, a lungo termine, va ad inficiare la maturazione e la produzione dei globuli rossi. Si è dimostrato quindi come in una condizione di infiammazione cronica clinica o subclinica si riscontrino elevati valori di

RDW, nonostante non si possa considerare il valore di RDW come marker diagnostico della condizione di MetS (Sánchez-Chaparro et al., 2010).

In uno studio Vayá et al. (2013) descrivono come il valore di RDW possa essere associato ad uno stato infiammatorio acuto e cronico in pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES). Tale parametro risulta essere positivamente correlato al fibrinogeno ed alla proteina C reattiva in pazienti non anemici affetti da LES ed inversamente correlato all'emoglobina (Hb) in pazienti anemici affetti da LES.

Il valore di RDW sembra quindi essere fortemente connesso sia alla condizione di anemia che allo stato infiammatorio (Vayá et al., 2013).

Il parametro eritrocitario RDW è stato studiato in molte altre patologie su base infiammatoria o autoimmune: è stato riscontrato essere elevato in pazienti con artrite reumatoide (AR) indipendentemente dalla presenza di anemia (Lee e Kim, 2010), così anche nella patologie infiammatorie dell'intestino (dall'inglese *inflammatory bowel disease*, IBD), in cui il valore di RDW risulta superare gli intervalli di normalità ed essere un fattore indipendente correlato alla fase di progressione della malattia, in presenza o meno di condizioni di anemia (Song et al., 2012).

Successivamente è stato dimostrato dai medesimi gruppi di lavoro che il valore di RDW è strettamente correlato a proteine di fase acuta dell'infiammazione in particolare alla proteina C reattiva in pazienti con AR anemici e non anemici (Lee e Kim, 2010), ed in pazienti in fase acuta di IBD che non presentano una condizione di anemia (Yesil et al., 2011). Ulteriore associazione di elevati valori di RDW ed alterazioni della microvascolarizzazione sono stati riportati da uno studio in cui il valore di RDW risulta essere un efficace marker di infiammazione in pazienti con diabete di tipo 2 (Sherif et al., 2013).

Risulta essere ancora poco chiaro il meccanismo fisiopatologico che giustifica il ruolo di RDW nello sviluppo di questi processi patologici.

3. IPERTENSIONE POLMONARE

L'ipertensione polmonare (IP) è una condizione emodinamica e fisiopatologica definita come aumento dei valori di pressione arteriosa polmonare (PAP) media ≥ 25 mmHg a riposo documentato mediante cateterismo cardiaco destro (CCdx) (Rich et al., 1987). La diagnosi definitiva di IP richiede la misurazione della pressione arteriosa sistolica polmonare (PASP) e media (PAP) tramite cateterismo cardiaco destro ed il rilievo di valori superiori a 30 mmHg e 20 mmHg rispettivamente. La procedura di CCdx essendo un metodo invasivo in medicina veterinaria non è frequentemente utilizzata, poiché necessita di una sedazione profonda o dell'anestesia del paziente e spesso risulta essere troppo rischiosa per pazienti in condizioni cliniche instabili, oppure non economicamente affrontabile da parte dei proprietari (Mercier et al., 2010). Alternativamente la valutazione della pressione arteriosa polmonare può essere calcolata tramite la misurazione con metodo Doppler del rigurgito trans-valvolare tricuspide o dell'insufficienza della valvola polmonare.

La pressione arteriosa polmonare è determinata da una serie di fattori tra cui la gittata del ventricolo destro (VD), le resistenze arteriose vascolari polmonari (RAP), e la pressione venosa polmonare (PVP) (Stepien, 2009). Un aumento del flusso attraverso le arterie polmonari determina un aumento della PAP. Un aumento nell'attività della muscolatura liscia dei vasi polmonari, fenomeni ipossici, aumento della viscosità del sangue o la presenza di ostruzioni al flusso vascolare, determinano un aumento delle RAP, e questo determina incremento della PAP. La PVP, che aumenta nelle condizioni di insufficienza cardiaca sinistra, in cui vi è un incremento cronico della pressione a livello dell'atrio sinistro, contribuisce ad un aumento della PAP. L'IP può quindi caratterizzare molteplici condizioni cliniche, complicando situazioni in cui sono presenti patologie cardiache congenite o acquisite, piuttosto che patologie polmonari.

3.1 FISIOPATOLOGIA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE

L'IP si sviluppa quando esiste un alterato equilibrio tra i fattori che controllano la vasocostrizione arteriosa polmonare, la vasodilatazione, l'attivazione piastrinica e la proliferazione delle cellule muscolari lisce (Stepien, 2009). Tra i fattori che influenzano questi meccanismi, troviamo una serie di sostanze che giocano un ruolo fondamentale:

Eicosanoidi: prostaglandine e trombossani

Le prostaglandine sono sostanze definite *hormone-like* sintetizzate, metabolizzate e rilasciate dal polmone. Le prostacicline e le prostaglandine E_1 provocano vasodilatazione, ipertrofia e rimodellamento vascolare ed inibiscono l'aggregazione piastrinica. D'altra parte le prostaglandine $F_{2\alpha}$ e le prostaglandine A_2 provocano vasocostrizione (Bonow et al., 2011; McLaughlin et al., 2009).

I trombossani, in particolare il trombossano A_2 , sono sostanze derivanti dalle prostaglandine e determinano vasocostrizione ed attivazione piastrinica. In medicina umana è stato documentato che in pazienti con IP è presente un'alterazione dell'equilibrio prostacicline-trombossani con sviluppo di vasocostrizione arteriosa, trombosi e proliferazione cellulare (Christman et al., 1992).

Ossido Nitrico (NO)

L'ossido nitrico è sintetizzato a livello cellulare tramite l'enzima ossido nitrico sintetasi. Una volta prodotto, viene rilasciato dalle cellule dell'endotelio vascolare e viaggia verso le cellule muscolari lisce. A questo livello, l'ossido nitrico stimola l'enzima guanilato ciclasi che catalizza la reazione che porta alla formazione di guanosin-monofosfato ciclico (cGMP) dalla guanosin-trifosfato (GTP), favorendo un aumento della concentrazione di cGMP. La cGMP inibisce i canali per il rilascio del calcio dal reticolo endoplasmatico e provoca vasodilatazione. La vasodilatazione è controllata dalla fosfodiesterasi 5 che, inattivando la cGMP, limita il processo vasodilatativo. L'ossido nitrico inoltre inibisce l'attivazione piastrinica e l'ipertrofia delle cellule muscolari lisce (Ichinose et al., 2004).

Endotelina-1

L'endotelina-1 (ET-1) è un peptide rilasciato dall'endotelio vascolare in risposta alle variazioni di flusso ematico, stiramento delle pareti vascolari, ossigenazione, e concentrazione di trombina (Farber e Loscalzo, 2004). L'ET-1 provoca vasocostrizione e stimola la proliferazione delle cellule della muscolatura liscia ed il rimodellamento vascolare (McLaughlin et al., 2009). La produzione di ET-1 è inibita dalle prostacicline e da NO (Bonow et al., 2011). L'ET-1 è un potente vasocostrittore che, quando è presente in alte concentrazioni, risulta essere correlato ad una peggior prognosi in pazienti umani con IP (Rubens et al., 2001), ed in medicina veterinaria è stato confermato essere presente in elevate concentrazioni in cani con IP (Uchida et al., 2005).

Angiotensina II

L'angiotensina II è un peptide prodotto dall'enzima angiotensin-converting enzyme (ACE) a partire dall'angiotensina I. In modelli animali di IP, l'IP è associata ad un aumento dell'espressione dell'enzima ACE e della sua attività (Bonow et al., 2011). L'angiotensina II provoca vasocostrizione e rimodellamento vascolare (Bonow et al., 2011).

Ipossia alveolare

L'ipossia alveolare, sia essa acuta o cronica, provoca vasocostrizione della circolazione polmonare. La vasocostrizione permette al sangue deossigenato di dirigersi verso le zone del polmone maggiormente ventilate e migliora il rapporto ventilazione perfusione: ciò permette di avere un miglioramento nella saturazione del sangue nell'immediato, ma in condizioni di ipossia cronica, in cui la tensione di ossigeno permane bassa per un lungo periodo, la vasocostrizione polmonare esita in un incremento della PAP e quindi in IP.

3.2 CLASSIFICAZIONE CLINICA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE

La classificazione della condizione clinica di ipertensione polmonare a cui si fa riferimento in medicina veterinaria per il cane viene estrapolata dalla classificazione clinica della medicina umana, recentemente rivalutata dalla World Health Organization (WHO) nell'anno 2008 durante il 4° Simposio Mondiale sull'Ipertensione Polmonare riconoscendo il *Dana Point classification system* (Humbert M e McLaughlin VV, 2009), il quale veniva ulteriormente aggiornato l'anno successivo (Simonneau et al., 2009). Vengono dunque riconosciuti cinque diversi gruppi di ipertensione polmonare elencati come segue:

1. Ipertensione arteriosa polmonare (IAP)

- 1.1 Idiopatica (IAP1)
- 1.2 Ereditaria
 - 1.2.1 BMPR2
 - 1.2.2 ALK1, endoglin (con o senza teleangectasia emorragica familiare)
 - 1.2.3 Non nota
- 1.3 Legata all'assunzione di farmaci e tossine
- 1.4 Associata (IAPA)
 - 1.4.1 Malattie del tessuto connettivo
 - 1.4.2 Infezione da HIV
 - 1.4.3 Ipertensione portale
 - 1.4.4 Cardiopatie congenite
 - 1.4.5 Schistosomiasi
 - 1.4.6 Anemie emolitiche croniche
- 1.5 Ipertensione polmonare persistente del neonato

1'. Malattia veno-occlusiva polmonare e/o emangiomatosi capillare polmonare (MVOP)

2. Ipertensione polmonare dovuta a malattie del cuore sinistro

- 2.1 Disfunzione sistolica
- 2.2 Disfunzione diastolica
- 2.3 Patologie delle valvole

3. Ipertensione polmonare dovuta a malattie del parenchima polmonare e/o ipossiemia

- 3.1 Broncopneumopatia cronica ostruttiva
- 3.2 Malattie interstiziali polmonari
- 3.3 Patologie polmonari con pattern misto ostruttivo e restrittivo
- 3.4 Disordini della ventilazione durante il sonno
- 3.5 Ipoventilazione alveolare
- 3.6 Esposizione cronica ad elevate altitudini
- 3.7 Anomalie dello sviluppo

4. Cuore polmonare cronico tromboembolico (CPCTE)

- 4.1 Ostruzione tromboembolica delle arterie polmonari prossimali
- 4.2 Ostruzione tromboembolica delle arterie polmonari distali
- 4.3 Embolie polmonari non trombotiche (tumori, parassiti, corpi estranei)

5. IP con meccanismi patogenetici non chiari e/o multifattoriali

- 5.1 Patologie ematologiche: disturbi mieloproliferativi, splenectomia
- 5.2 Patologie sistemiche: sarcoidosi, istiocitosi polmonare a cellule di Langerhans, linfangioleiomiomatosi, neurofibromatosi, vasculite
- 5.3 Patologie metaboliche: glicogenosi, malattia di Gaucher, patologie tiroidee
- 5.4 Altro: ostruzione tumorale, mediastinite fibrosante, insufficienza renale cronica in dialisi

LK1 = gene "activin-receptor-like kinase 1"; BMPR2 = recettore di tipo II della bone morphogenetic protein; HIV = virus dell'immunodeficienza acquisita umana; IAP = ipertensione arteriosa polmonare; IAPA = ipertensione arteriosa polmonare associata.

3.3 GRUPPI DI CLASSIFICAZIONE CLINICA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE

GRUPPO 1

IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE (IAP)

L'IAP è una condizione clinica caratterizzata dalla presenza di IP pre-capillare in assenza di altre cause di IP pre-capillare, come IP dovuta a patologie polmonari, cuore polmonare cronico tromboembolico o altre patologie rare. Nonostante l'IAP idiopatica sia stata descritta nel cane, essa è scarsamente riportata (Kellihan et al., 2010).

In medicina umana le anemie emolitiche croniche, come l'anemia a cellule falciformi (Gladwin et al., 2004), la talassemia, la sferocitosi ereditaria, la stomatocitosi e l'anemia emolitica microangiopatica possono portare allo sviluppo di IAP e, pertanto, sono state incluse tra le forme di IAPA.

IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE ASSOCIATA A SHUNT CARDIACI CONGENITI (CC)

Questa forma di IAP è la più frequentemente rappresentata in medicina veterinaria nei cani con IAP del *gruppo 1*. Tra i difetti congeniti più frequentemente rappresentati nel cane ricordiamo la persistenza del dotto arterioso, difetti atriali, difetti del setto interventricolare. La presenza di uno shunt sistemico-polmonare determina la persistenza nel tempo di un aumentato flusso ematico e di elevati regimi di pressione a livello delle strutture vascolari polmonari responsabile dell'aumento delle RAP. Quando le RAP raggiungono o superano le resistenze vascolari sistemiche si realizza l'inversione dello shunt (sindrome di Eisenmenger) (Beghetti et al., 2009).

I segni e i sintomi della sindrome di Eisenmenger sono legati alla presenza di IP, alla ridotta saturazione arteriosa di ossigeno e all'eritrocitosi secondaria. I sintomi includono

dispnea, astenia e sincopi. Nei pazienti con IAP associata a CC senza inversione dello shunt, la cianosi e l'eritrocitosi possono essere lievi o moderate. I pazienti affetti da sindrome di Eisenmenger possono presentare episodi di emottisi, eventi cerebrovascolari, ascessi cerebrali, alterazione dei processi della coagulazione e morte improvvisa. Inoltre, la presenza dello shunt destro-sinistro permette di ridurre il sovraccarico ventricolare destro e consente di preservare la pressione arteriosa sistemica, anche se a spese di ipossiemia e cianosi. I pazienti con CC (in particolare quelli che non presentano shunt) possono anche sviluppare IP dovuta a patologie del cuore sinistro (*gruppo 2*) o a patologie polmonari concomitanti (*gruppo 3*).

GRUPPO 2

IPERTENSIONE POLMONARE DOVUTA A PATOLOGIE DEL CUORE SINISTRO

Questa categoria sviluppa una condizione di ipertensione polmonare secondaria a patologie del cuore sinistro. L'insufficienza cardiaca sinistra cronica provoca un aumento della pressione dell'atrio sinistro, che porta ad un aumento della pressione venosa polmonare. In questa condizione si manifestano edema polmonare, ipossia ed ipertensione polmonare arteriosa reattiva, come precedentemente descritto. In medicina veterinaria ed in particolare nella specie canina, la più frequente causa di ipertensione venosa polmonare è rappresentata dalla malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV).

La malattia degenerativa cronica valvolare è la cardiopatia acquisita più comune nel cane, nel quale rappresenta circa il 75% delle malattie cardiache; tale patologia risulta essere maggiormente diffusa in soggetti di piccola taglia e di età avanzata, nonostante in alcune razze come il Cavalier King Charles Spaniel ed il Bassotto Tedesco, sia stata dimostrata in soggetti di età più giovane rispetto alle altre razze (Häggström et al., 2009) in cui si sospetta una base ereditaria (Obayashi et al., 2011). Le modificazioni fisiopatologiche a livello cardiaco che si verificano in corso di MDCV provocano ispessimento dei lembi valvolari con conseguente prolasso di uno o di entrambi i lembi, e quindi rigurgito valvolare. Presente anche coinvolgimento delle corde tendinee che divengono spesse e deboli e possono rompersi (Obayashi et al., 2011). La degenerazione dei lembi valvolari provoca la formazione del rigurgito mitralico che, nel progredire della patologia, è responsabile del rimodellamento cardiaco (caratterizzato da dilatazione atriale e ventricolare sinistra), nonché ipertrofia miocardica eccentrica (Killingsworth et al., 2008), aumento della frequenza cardiaca (FC), modulazione del tono vascolare sistemico e del volume dei fluidi extracellulari (Häggström et al., 1997). Le conseguenze principali della dilatazione dell'AS includono la compressione del bronco principale sinistro, lo sviluppo di aritmie sopraventricolari e l'aumento della pressione del letto polmonare, che porta alla formazione di edema (Guglielmini et al., 2003). I meccanismi fisiopatologici che in questa condizione generano ipertensione polmonare possono includere fenomeni di

vasocostrizione riflessa indotti dalla stimolazione di recettori da stiramento localizzati a livello dell'ASE nelle vene polmonari e disfunzione endoteliale delle AP che possono favorire la vasocostrizione e la proliferazione delle cellule della parete vascolare.

La MDCV è caratterizzata da una lunga fase preclinica seguita da una progressione cronica; nonostante ciò è riportato che cani in fase preclinica frequentemente muoiono per svariati altri motivi senza mai sviluppare ICC (Borgarelli et al., 2008). Riportato che in cani affetti da MDCV in forma asintomatica, la presenza di IP, aritmie cardiache e la rottura delle corde tendinee, sono da considerare fattori prognostici negativi, che possono accelerare lo scompenso cardiaco (Chetboul et al., 2009).

GRUPPO 3

IPERTENSIONE POLMONARE DOVUTA A PATOLOGIE POLMONARI E/O IPOSSIEMIA

In questo gruppo includiamo i soggetti che sviluppano IP secondariamente a patologie polmonari primarie oppure a condizioni di ipossia cronica. In medicina umana le patologie più frequentemente associate all'IP del *gruppo 3* sono la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), patologie del tessuto interstiziale polmonare e le apnee notturne (McLaughlin et al., 2009). Nella BPCO la presenza di IP rappresenta un indicatore di prognosi sfavorevole (Oswald-Mammosser et al., 1995). Nelle patologie polmonari interstiziali, la IP rappresenta un fattore prognostico sfavorevole e il valore di PAP costituisce il principale parametro correlato alla mortalità (Lettieri et al., 2006). In medicina veterinaria nel cane, l'IP del *gruppo 3* è associata alla fibrosi polmonare, polmoniti, patologie tracheobronchiali, e neoplasie (Borgarelli et al., 2004). Riportata la presenza di IP in cani di razza West Highland White Terrier con patologia polmonare interstiziale cronica, con una percentuale di prevalenza del 40% (Schober et al., 2006).

I sintomi e i segni clinici di IP possono essere difficili da identificare nei pazienti affetti da patologie respiratorie. Peraltro, nella BPCO, l'edema periferico può non essere un segno di scompenso del VD in quanto potrebbe derivare dagli effetti di ipossiemia e ipercapnia sul sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA). Inoltre, anche la coesistenza di patologie del cuore sinistro, che sono comunemente associate alle patologie respiratorie croniche, potrebbe contribuire ad aumentare i valori di PAP. Come per le altre forme di IP, l'ecocardiografia costituisce il migliore strumento di screening per l'identificazione della IP. Attualmente non esiste una terapia specifica per la IP dovuta a BPCO o patologie polmonari interstiziali. In medicina umana è stato dimostrato che la somministrazione di ossigeno a lungo termine riduce parzialmente la progressione della IP nella BPCO. Nonostante ciò, con questo trattamento i valori di PAP raramente si normalizzano e le anomalie strutturali della parete vascolare polmonare rimangono inalterate (Nunes et al., 2003).

GRUPPO 4

CUORE POLMONARE CRONICO TROMBOEMBOLICO (CPCTE)

Il cuore polmonare cronico tromboembolico (CPCTE) rappresenta una delle forme più frequenti di IP pre-capillare in medicina umana e spesso è associata a ostruzione al flusso delle arterie polmonari in associazione ad embolia polmonare acuta o cronica od a processi neoplastici. Quando le lesioni ostruttive vascolari sono sufficienti a determinare un aumento dei valori di PAP, si avvia un processo di rimodellamento della parete vascolare polmonare che determina la progressione della IP anche in assenza di ulteriori eventi tromboembolici (Rubin et al., 2006). Anche se i meccanismi che legano queste condizioni al CPCTE non sono stati completamente chiariti, i processi infiammatori cronici oppure i processi infettivi cronici che coinvolgono la circolazione ematica, potrebbero svolgere un ruolo determinante (Bonderman et al., 2009).

In medicina veterinaria nel cane, lo sviluppo di IP del *gruppo 4* causata da tromboembolismo polmonare è associata sindromi da ipercoagulabilità, disfunzione endoteliale, o stasi del ematica. Le patologie frequentemente associate sono l'anemia emolitica immunomediata, le neoplasie, le nefropatie ed enteropatie proteino-disperdenti, l'iperadrenocorticismismo, la pancreatite, la sepsi e i traumi (Kellihan et al., 2010; Johnson et al., 1999). Viene inclusa in questa categoria anche la parassitosi da *Dirofilaria immitis* in quanto responsabile della formazione di tromboembolismi parassitari (Kellihan et al., 2010).

GRUPPO 5

IPERTENSIONE POLMONARE CON MECCANISMI PATOGENETICI NON CHIARI E/O MULTIFATTORIALI

In questo gruppo sono incluse le condizioni di ipertensione polmonare le cui cause sono di origine multifattoriale o di eziologia non ben determinata, scarsamente riportato in medicina veterinaria. Le cause più frequentemente riportate nel cane sono neoplasie polmonari che generano compressioni della vascolarizzazione polmonare.

In medicina umana nel primo sottogruppo si descrivono diversi disordini ematologici che determinano IP. L'IP è stata riportata in condizioni di disordine mieloproliferativo come la policitemia vera, la trombocitopenia essenziale e la leucemia mieloide cronica (Dingli et al, 2001). L'ostruzione della vascolarizzazione polmonare ad opera di processi metastatici embolici di origine neoplastica rappresenta una progressiva causa di IP (Roberts et al, 2003). In fine l'IP è riportata in una serie di patologie allo stadio terminale tra cui la sindrome nefrosica (dall'inglese *end-stage renal disease*) in cui alterazioni ormonali, metaboliche e pressorie, portano ad una progressiva vasocostrizione del circolo polmonare (Yigla et al, 2003).

3.4 CLASSIFICAZIONE EMODINAMICA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE: IP PRE-CAPILLARE ED IP POST-CAPILLARE

Per identificare da un punto di vista emodinamico la condizione di ipertensione polmonare, si suddivide l'ampia categoria precedentemente illustrata in due grandi gruppi:

IPERTENSIONE POLMONARE PRE-CAPILLARE: Conseguenza di un ostacolo al flusso ematico attraverso le arteriole pre-capillari. Questo tipo di IP è caratterizzata da PAP media >25 mmHg, pressione atriale sinistra nella norma (<12 mmHg) ed elevate RAP.

IPERTENSIONE POLMONARE POST-CAPILLARE: Conseguenza dell'aumento della pressione a livello di atrio sinistro, ed è presente prevalentemente in pazienti con patologie del cuore sinistro. Tale condizione è caratterizzata da PAP media > 25 mmHg, e da aumento della pressione a livello dell'atrio sinistro (>12 mmHg).

Le varie classi di IP vengono accorpate in questi due grandi gruppi secondo la valutazione emodinamica come illustrato nella Tabella A.

Tabella A. Classificazione emodinamica dell'ipertensione polmonare.

Definizione	Caratteristiche	Gruppo clinico ^a
Ipertensione polmonare(IP)	PAP media ≥ 25 mmHg	Tutti
IP pre-capillare	PAP media ≥ 25 mmHg POP ≤ 15 mmHg PC normale o ridotta^b	1. Ipertensione arteriosa polmonare 3. IP da malattie polmonari 4. CPCTE 5. IP con meccanismi non chiari e/o multifattoriali
IP post-capillare	PAP media ≥ 25 mmHg POP > 15 mmHg PC normale o ridotta^b	2. IP da malattie del cuore sinistro
Passiva	GTP ≤ 12 mmHg	
Reattiva (out of proportion)	GTP > 12 mmHg	

^a secondo Classificazione WHO 2009; ^b una portata cardiaca (PC) elevata può essere riscontrata in condizioni caratterizzate da circolo ipercinetico come gli shunt sistemico-polmonari (solo nella circolazione polmonare), l'anemia, l'ipertiroidismo, ecc.

CPCTE = cuore polmonare cronico tromboembolico; GTP = gradiente di pressione trans-polmonare (PAP media – POP media); IP = ipertensione polmonare; PAP = pressione arteriosa polmonare; PC = portata cardiaca; POP = pressione di occlusione polmonare.

3.5 DIAGNOSI CLINICA DI IPERTENSIONE POLMONARE

I. PRESENTAZIONE CLINICA

I sintomi dell'IP sono aspecifici e comprendono tosse, dispnea, intolleranza all'esercizio, astenia, sincope e tensione addominale (Rich et al., 1987). Sintomi a riposo sono riferiti soltanto nei casi molto avanzati. La cianosi può manifestarsi per una diminuzione della gittata cardiaca con vasocostrizione periferica (cianosi periferica) oppure ipossiemia associata ad alterazione del rapporto ventilazione-perfusione (cianosi centrale).

La riduzione della capacità di riempimento ventricolare che si manifesta in pazienti con IP associata ad una condizione di ipossia può portare ad intolleranza all'esercizio ed ad un elevata incidenza di episodi sincopali.

I segni clinici dell'IP comprendono impulso parasternale sinistro, aumento di intensità della componente polmonare del secondo tono (S2), soffio pansistolico da rigurgito tricuspideale, soffio diastolico da insufficienza polmonare e terzo tono (S3) di origine ventricolare destra (Kittleson e Kienle, 1998). La presenza di terzo tono (S3) è un indicatore precoce di insufficienza ventricolare destra (Tancredi, 1992; Klinger et al., 1991).

Il turgore giugulare, l'epatomegalia, gli edemi periferici, l'ascite e l'ipoperfusione periferica (estremità fredde) caratterizzano le fasi più avanzate della malattia (Galiè et al., 2004): i cani con scompenso ventricolare destro o patologia polmonare presentano turgore giugulare, versamento pleurico, ascite o edemi sottocutanei (Barst et al., 2004).

II. ELETTROCARDIOGRAMMA

L'elettrocardiogramma (ECG) può fornire evidenze in grado di suggerire o sostenere una diagnosi di IP dimostrando la presenza di ipertrofia ventricolare destra con sovraccarico e di dilatazione atriale destra (Tilley, 1992).

L'assenza di questi aspetti non esclude la presenza di IP e nemmeno la presenza di un'importante compromissione emodinamica.

Le aritmie ventricolari sono rare, nonostante negli stadi avanzati della patologia possano essere presenti aritmie sopraventricolari, in particolare flutter atriale e fibrillazione atriale, che determina quasi sempre un ulteriore deterioramento clinico, riportato sia in medicina veterinaria (Borgarelli et al., 2008) che in medicina umana (Tongers et al., 2007).

III. RADIOGRAFIA DEL TORACE

La radiografia del torace evidenzia diverse anomalie nei cani con IP, ma nessuna di queste può essere definita come patognomica.

La cardiomegalia, in particolare l'aumento delle dimensioni del cuore destro, infiltrati polmonari, aumento del calibro delle arterie polmonari, sono reperti radiografici comunemente presenti nei cani con IP, ma anch'essi non sono considerati specifici.

La radiografia del torace consente di discernere ragionevolmente la presenza di patologie polmonari di grado moderato-severo (*gruppo 3*) evidenziando ispessimento delle pareti bronchiali, pattern polmonari interstiziali nodulari (pneumopatie infiammatorie o neoplastiche), pattern diffusi non strutturati (fibrosi polmonare), aumento del calibro vascolare delle arterie o di ipertensione venosa polmonare dovuta a patologie del cuore sinistro (*gruppo 2*).

In generale, il grado di IP in un dato paziente non è correlato all'estensione delle alterazioni radiologiche.

La cardiomegalia può essere valutata soggettivamente, valutando la perdita del profilo fisiologico e l'aumento dell'area di contatto del cuore con lo sterno, piuttosto che tramite il metodo VHS (dall'inglese *Vertebral Heart Score*). Questo metodo prevede la misurazione della proiezione radiografica latero-laterale dell'asse lungo e dell'asse corto del cuore, correlandola alla lunghezza dei corpi vertebrali, partendo dal margine craniale della quarta vertebra toracica. I normali valori di VHS in un cane sano sono compresi tra $9,7 \pm 0,5$.

Nella valutazione delle dimensioni cardiache, un'attenzione particolare va posta al tipo di torace del cane ed alla razza, in quanto è riportato che razze come il Boxer, il Pastore Tedesco, il Cavalier King Charles Spaniel, lo Whippet, il Greyhound ed il Beagle, presentano valori di VHS più elevati rispetto al sopracitato range di riferimento. Le radiografie del torace risultano comunque essenziali per il monitoraggio dei pazienti con diagnosticata o sospetta IP e di pazienti affetti da MVCD: è raccomandabile l'esecuzione di proiezioni laterali destre e dorsoventrali, invece delle classiche proiezioni laterali sinistre e ventrodorsali, che classicamente sono impiegate per indagare il torace (Hansson et al., 2009).

IV. ECOCARDIOGRAFIA

L'ecocardiografia transtoracica permette di ottenere diversi parametri che permettono di stimare la PAP: la misura della PAP si ottiene attraverso la misura della velocità massima del flusso di rigurgito tricuspideale. L'equazione di Bernoulli semplificata descrive la relazione tra la velocità di rigurgito tricuspideale e il gradiente pressorio di picco del rigurgito tricuspideale:

$$PAP = 4 \times (\text{velocità di rigurgito tricuspideale})^2$$

Questa equazione consente la stima della pressione sistolica in arteria polmonare (AP) tenendo conto della pressione atriale destra (PAD): pressione sistolica in AP = gradiente di pressione del rigurgito tricuspideale + PAD stimata. La PAD può essere stimata in base al

diametro e alle escursioni respiratorie della vena cava caudale o inferiore anche se spesso si assume un valore costante di 5 o 10 mmHg.

In medicina veterinaria, i cani che non presentano dilatazione atriale destra la PAD si stima essere 5 mmHg, 10 mmHg in cani con dilatazione dell'atrio destro ma in assenza di segni di insufficienza cardiaca destra, 15 mmHg se è presente anche insufficienza cardiaca (Kittleson e Kienle, 1998).

Suggeriscono la presenza di IP una velocità di picco del rigurgito trans-tricuspidale (TR-Vmax) ≥ 2.8 m/s stima una PAP ≥ 32 mmHg, ed una velocità del flusso attraverso l'arteria polmonare ≥ 2.2 m/s stima una PAP ≥ 20 mmHg.

Deve essere sempre valutata la presenza di altre variabili ecocardiografiche che potrebbero suggerire o rinforzare il sospetto di IP indipendentemente dalla velocità del rigurgito tricuspidale. Esse comprendono l'aumento della velocità del rigurgito polmonare e la riduzione del tempo di accelerazione del flusso del tratto di efflusso del VD. Sono indicativi di IP anche l'aumento delle dimensioni delle camere cardiache di destra, la morfologia alterata e il movimento anomalo del setto interventricolare, l'ipertrofia delle pareti del VD e la dilatazione dei rami principali dell'AP anche se tendono a manifestarsi nelle fasi più avanzate della malattia.

Per una valutazione accurata della PAP in cani con rigurgito tricuspidale, è necessario escludere la stenosi polmonare, dimostrando una normale velocità di flusso trans-valvolare nell'arteria polmonare e documentando il profilo del flusso attraverso la metodica Doppler.

In condizioni di IP ed insufficienza polmonare, a seconda della gravità della patologia e della PAP si verificano modificazioni del profilo del flusso trans-valvolare. In situazioni di IP da infestazione di parassiti (*Dirofilaria immitis*) è possibile osservarli all'interno del cuore destro o dell'arteria polmonare destra.

In corso di MDCV e di condizioni di IP del *gruppo 2*, la funzionalità ventricolare sistolica e diastolica possono essere diminuite: queste informazioni in medicina umana sono indispensabili per la scelta di pazienti da sottoporre ad interventi chirurgici, ma in

veterinaria non risultano così importanti, perché raramente vengono tentati approcci chirurgici.

Una diminuzione della funzionalità ventricolare sistolica porta ad avere frazione di eiezione (FE) e frazione d'accorciamento (dall'inglese *fractional shortening*, FS) aumentate (generalmente la FS è maggiore del 50% se non si è in corso di disfunzione miocardica, tra il 33% ed il 45% quando c'è alterazione della contrattilità miocardica in seguito all'aumento del precarico e della diminuzione del postcarico), diametro del ventricolo sinistro alla fine della sistole (dall'inglese *left ventricular end systolic diameter*, LVDs) o volume del ventricolo sinistro alla fine della sistole aumentati, ridotta escursione della parete ventricolare sinistra e ridotto ispessimento della parete ventricolare sinistra.

Una diminuzione della funzionalità ventricolare diastolica è invece caratterizzata da alterazione dei rapporti tra le onde del flusso trans-mitralico, valutate con il Doppler tissutale. In fasi avanzate di MDCV si può assistere ad aumento delle pressioni di riempimento con conseguente aumento del diametro (LVDs) ed del volume del ventricolo sinistro (*left ventricular end diastolic diameter*, LVDd) alla fine della diastole (Bonagura e Schober, 2009).

Alcune variabili ecocardiografiche possono essere utili nell'identificazione di soggetti ad alto rischio di progressione della patologia; tra queste la dilatazione dell'atrio sinistro (dall'inglese *left atrium*, LA) sembra essere la più affidabile (Borgarelli et al., 2008).

Per predire l'eventuale insorgenza di ICC in corso di MDCV è molto importante valutare il rapporto atrio sinistro su aorta (LA/Ao), il LVDd ed il LVDs, l'indice del volume alla fine della diastole e quello alla fine della sistole, nonché il pattern del flusso trans-mitralico (Häggström et al., 2009).

V. *DIAGNOSI LABORATORISTICA: MARKER BIOCHIMICI*

Nell'ultimo decennio i marker biochimici sono stati oggetto di grande attenzione in quanto costituiscono un interessante strumento non invasivo per la valutazione e il monitoraggio della disfunzione del VD in pazienti affetti da IP.

PEPTIDI NATRIURETICI

Il peptide natriuretico atriale (ANP) e il peptide natriuretico cerebrale (BNP) condividono proprietà fisiologiche simili. Tali biomarker vengono rilasciati in seguito ad ingrandimento delle camere cardiache e quindi sono riscontrabili in condizioni di IP post-capillare (*gruppo 2*).

Entrambi inducono vasodilatazione e natriuresi e sono rilasciati dal miocardio in risposta allo stress di parete. In cardiologia dei piccoli animali è stato maggiormente studiato il tipo A (ANP) ed tipo B (BNP), considerati marker di aumento dello stress miocardico (Braunwald, 2008).

Nell'uomo la produzione ed il rilascio di ANP e BNP sono legate principalmente alla distensione del tessuto miocardico, sebbene stimoli come l'attivazione del sistema nervoso simpatico (SNS) e del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), l'endotelina 1, l'ischemia e l'infiammazione sono coinvolti anch'essi nel rilascio (Goetze et al., 2003; Magga et al., 1998; Rademaker et al., 2004; Vila et al., 2008; Wiese et al., 2000).

Nella pratica clinica, l'interesse relativo all'utilizzo dei peptidi natriuretici nel monitoraggio dello scompenso del VD da IP cronica è stato focalizzato sul BNP. Lo stadio finale nella sintesi del BNP consiste nel clivaggio di un precursore ad elevato peso molecolare, il proBNP, in un segmento N-terminale biologicamente inattivo ((dall'inglese *N-terminal-pro-brain natriuretic peptide*, NT-pro-BNP) e nel vero e proprio BNP a basso peso molecolare. NT-pro-BNP è caratterizzato da un'emivita più lunga e una maggiore stabilità sia in circolo che dopo campionamento.

In medicina umana è riportato che l'aumento dei livelli plasmatici di NT-pro-BNP durante il follow-up risulta associato ad una prognosi sfavorevole (Williams et al., 2006). In medicina veterinaria è stato dimostrato che elevati livelli di NT-pro-BNP sono correlati ad una maggior severità nella progressione clinica della MDVD (Serres et al., 2009) e in condizioni di IP *gruppo 2* (DeFrancesco et al., 2007).

Secondo gli studi più recenti, si evidenzia che in cani con segni respiratori dovuti a cause sconosciute ci siano maggiori indicazioni per testare la concentrazione plasmatica di NT-pro-BNP: valori inferiori a 900 pmol/L sono in particolare specifici di patologie respiratorie, mentre risultati superiori a 1800 pmol/L sono specifici di ICC. È quindi possibile discriminare l'origine della sintomatologia clinica nonostante i valori intermedi tra 900 e 1800 pmol/L debbano essere interpretati con cautela: è necessario infatti considerare i livelli di questa molecola all'interno del quadro clinico completo (Fine et al., 2008; Oyama e Singletary, 2010).

Il dosaggio della concentrazione di NT-pro-BNP presenta alcune limitazioni, rappresentate ad esempio da patologie sottostanti (patologie renali, patologie infettive, ipertensione arteriosa sistemica) e la somministrazione di farmaci che possono alterare il volume ematico (diuretici), e possano influenzarne le concentrazioni. La stabilità della molecola in vivo è altamente tempo e temperatura-dipendente, necessario quindi associare al monitoraggio laboratoristico anche il quadro clinico, o ulteriori analisi strumentali. È inoltre necessario ricordare che la variazione dei livelli di NT-pro-BNP in corso di patologia fluttuano durante l'arco della giornata, probabilmente a causa del ritmo circadiano o delle variazioni del volume ematico, e che il metodo di raccolta dei campioni, di maneggiamento ed i protocolli di spedizione possano influenzare i risultati ottenuti (O'Hanlon et al., 2007; Wu Ah, 2006).

Il dosaggio dei livelli plasmatici di BNP/NT-pro-BNP dovrebbe essere ad ogni modo raccomandato alla valutazione basale per la stratificazione del rischio e, considerate le implicazioni prognostiche, potrebbe essere utile per monitorare gli effetti dei trattamenti farmacologici. Nell'IAP, il mantenimento di ridotti livelli plasmatici o la riduzione dei livelli

di BNP/NT-pro-BNP potrebbero essere considerati marker di efficace controllo della malattia.

TROPONINE CARDIACHE

Le troponine sono sostanze largamente studiate in corso di patologia cardiaca sia in medicina umana che in medicina veterinaria. Le troponine rappresentano un complesso di proteine intracellulari costituite da 3 subunità (cTnI, cTnT e cTnC) che intervengono nel meccanismo di accoppiamento delle proteine sarcomeriche durante il processo di eccitazione-contrazione (Oyama e Sisson, 2004).

La cTnI è la componente inibitoria del complesso delle troponine cardiache ed impedisce l'interazione tra l'actina e la miosina fino a quando il calcio intracellulare è legato dalla cTnC.

La cTnI normalmente è connessa ai filamenti di actina tramite la cTnC, ma in risposta a danni del sarcomero viene rilasciata e dunque si libera nel citoplasma e nello spazio extracellulare.

Nell'uomo livelli plasmatici elevati di troponina cardiaca T e I sono marker specifici validati di danno miocardico e sono indicatori prognostici nelle sindromi coronariche acute e nell'embolia polmonare acuta (Torbicki et al., 2003).

E' stata dimostrata esserci elevata omologia della sequenza amminoacidica della cTnI umana e quella canina, e ciò consente l'utilizzo di kit prodotti ad uso umano anche per campioni ematici di cane (Guglielmini et al., 2010).

Alte concentrazioni di cTnI e cTnT sono un indicatore sensibile e specifico di danno miocardico e necrosi cellulare; in corso di cardiomiopatia, MDCV e stenosi subaortica congenita si riscontrano elevati livelli ematici di tale biomarker. Recentemente è stato dimostrato che in cani con IP pre-capillare non presentano un rialzo significativo di cTnI (Kelliher et al., 2011).

Riportato inoltre che in corso di MDCV la concentrazione di cTnI è aumentata sia in cani con ipertensione pre-capillare che post-capillare, mentre sembra che in cani con embolismo polmonare acuto il loro impiego sia di valore limitato (Guglielmini et al., 2010).

In medicina umana, altri biomarker sono attualmente oggetto di valutazione (Lankeit et al., 2008. Nickel et al., 2008) ma non hanno ancora avuto impiego nella pratica clinica.

VI. CATETERISMO DEL CUORE DESTRO

La diagnosi definitiva di IP si ottiene mediante la cateterizzazione del cuore destro e dell'arteria polmonare mediante un *end-hole* catetere angiografico (Grossman et al., 1996). Il cateterismo e l'angiografia della parte sinistra del cuore e permette di escludere la presenza di difetti congeniti e per una più accurata definizione dell'eziopatologia dell'IP. Per effettuare il cateterismo cardiaco in medicina veterinaria è necessaria una profonda sedazione o l'anestesia del paziente, e questo determina un grosso limite per lo svolgimento della procedura, specialmente i pazienti critici. In animali con IP solitamente la pressione rilevata a livello del ventricolo destro è elevata. In animali con IP post-capillare dovuta ad insufficienza cardiaca sinistra, la pressione capillare polmonare è molto elevata, mentre è normale o bassa in pazienti con patologie polmonari ed ipertensione polmonare pre-capillare.

VII. ALTRI STRUMENTI DIAGNOSTICI

Un approccio diagnostico completo, frequentemente utilizzato in medicina umana ma di scarso impiego in medicina veterinaria, prevede l'impiego di ulteriori test come:

- Scintigrafia polmonare perfusionale/ventilatoria
- Tomografia computerizzata ad alta risoluzione, tomografia computerizzata con mezzo di contrasto ed angiografia polmonare
- Risonanza magnetica cardiaca
- Test ematici ed immunologici
- Ecografia addominale
- Cateterismo cardiaco destro e test di vasoreattività

Tali procedure rendono possibile stabilire un algoritmo diagnostico in cui valutare la natura e gravità della patologia, associando parametri clinici, ecocardiografici ed emodinamici.

3.6 TERAPIA DELL'IPERTENSIONE POLMONARE

La terapia per il trattamento dell'IP nel cane ha diversi scopi. Il primo obiettivo è quello di ridurre i segni clinici: ridurre la dispnea, l'intolleranza all'esercizio, la tosse e diminuire gli eventi sincopali. Il protocollo terapeutico dovrebbe essere scelto in modo da ridurre il tempo di ospedalizzazione del paziente, migliorarne la qualità di vita ed aumentare il tempo di sopravvivenza. Per raggiungere questi obiettivi è importante individuare la tipologia di IP da cui è affetto il paziente ed escludere, o trattare terapeuticamente quando possibile, ulteriori patologie che possano concorrere con lo sviluppo dell'IP o aggravarla.

I. TRATTAMENTO DELL'IPERTENSIONE POLMONARE PRE-CAPILLARE

ANALOGHI DELLE PROSTACICLINE

Le prostacicline, come precedentemente riportato, sono sostanze che provocano vasodilatazione, inibizione piastrinica ed effetti antiproliferativi (Mc Laughlin et al., 2009; Kitabatake et al., 1983).

I farmaci definiti come analoghi delle prostacicline includono l'esoprostenolo, il treprostil, ed l'iloprost. L'utilizzo degli analoghi delle prostacicline è stato dimostrato essere efficace nel trattamento dell'IP nel cane, ma solo in via sperimentale, non sono stati ancora pubblicati studi clinici per validarne l'impiego.

Questi farmaci migliorano la gittata cardiaca, aumentano la vasodilatazione, e migliorano le performance del ventricolo destro (Kerbaul et al., 2007; Zwissler et al., 1995). Sfortunatamente gli analoghi delle prostacicline sono farmaci incredibilmente costosi e non facilmente utilizzabili nella pratica clinica in medicina veterinaria.

AGONISTI DELLE ENDOTELINE

Come precedentemente discusso, l'ET-1 provoca vasocostrizione, proliferazione delle cellule muscolari lisce e rimodellamento vascolari. Antagonizzando l'effetto dell'ET-1, la pressione arteriosa polmonare diminuisce. I più comuni antagonista dell'ET-1 sono rappresentati dal bosentan, sitaxsentan e ambrisentan.

Questi farmaci vengono impiegati come terapia per via orale ed hanno dimostrato la loro efficacia in termini di riduzione dell'intolleranza all'esercizio, della pressione arteriosa polmonare, ed delle RAP in medicina umana (Channick et al., 2001). Gli effetti collaterali che vengono riportati sono l'insufficienza epatica dose-dipendente, anemia (Mc Laughlin et al., 2009).

Il bosentan è stato testato in medicina veterinaria nel cane in via sperimentale. In questi pazienti il principio attivo ha dimostrato essere efficace, riducendo il rimodellamento vascolare nella fase di progressione di IP, ha migliorato la funzionalità miocardica, e ridotto il rimodellamento ventricolare (Kim et al., 2000; Mishima et al., 2000).

Sfortunatamente mancano studi clinici che possano dimostrare l'efficacia di tali principi attivi in cani con IP sviluppata in condizioni che non siano un modello sperimentale. Anch'essi trovano poco spazio nel possibile impiego nella pratica clinica in medicina veterinaria a causa del costo molto elevato.

INIBITORI DELLA FOSFODIESTERASI DI TIPO 5

Esistono diversi inibitori della fosfodiesterasi di tipo 5 (PDE5) tra cui il sildenafil citrato, il tadalafil ed il vardenafil. Tali principi attivi sono inibitori specifici della PDE5, un enzima normalmente presente nella muscolatura liscia dei vasi polmonari.

Come precedentemente illustrato, l'enzima PDE5 idrolizza il guanosin monofosfato ciclico (cGMP). Quando le PDE5 sono inibite, la concentrazione di cGMP aumenta permettendo

la vasodilatazione. Tali principi attivi sono differenti per durata d'azione e per capacità di ridurre l'ipertrofia cardiaca, nonché nel grado di riduzione dell'IP (Ghofrani et al., 2004).

IL sildenafil è un inibitore della PDE5 con breve durata d'azione. L'impiego per il trattamento dell'IP nel cane è stato validato mediante studi clinici, ed è dimostrata la sua efficacia nel ridurre la PAP, migliorare la qualità di vita e di prolungare le aspettative di vita (Bach et al., 2006).

La dose raccomandata è di 1 a 3 mg/kg ogni 12 ore per via orale. Il costo del farmaco, seppur non proprio esiguo, risulta essere abbordabile per una terapia a lungo termine.

Gli effetti collaterali sono riferibili a sintomatologia gastrointestinale, ma sono riportati raramente.

PIMOBENDAN

Il pimobendan è un principio attivo registrato solo in medicina veterinaria per l'uso nel cane: questo ha un duplice meccanismo d'azione: questa molecola esplica un funzione di vasodilatazione mediata dall'inibizione della PDE3, nonché un effetto inotropo positivo associata alla sensibilizzazione al calcio.

Da un punto di vista clinico, è dimostrato che il pimobendan migliora le condizioni di IP del *gruppo 2*, ossia secondaria a MDCV (Atkinson et al., 2009).

II. TRATTAMENTO IPERTENSIONE POLMONARE POST-CAPILLARE

Il protocollo terapeutico scelto nel trattamento dell'IP del *gruppo 2*, ha come obiettivo di trattare i sintomi clinici dell'insufficienza cardiaca sinistra, che si manifesta in fasi avanzate della MDCV nel cane (Ettinger et al., 2006).

Il piano terapeutico per i pazienti che sviluppano insufficienza cardiaca in seguito a patologie del cuore sinistro o a degenerazione delle valvole, prevede l'utilizzo di farmaci con diversi meccanismi d'azione tra cui diuretici, vasodilatatori, inotropi positivi, inibitori del SRAA, antiaritmici, antiipertensivi ed altri ancora.

Tra i farmaci diuretici troviamo la furosemide, un principio attivo comunemente utilizzato nel cane per la sua rapidità d'azione. Questo principio attivo ha la capacità di ridurre il volume plasmatico, ridurre il precarico e di incrementare l'eliminazione renale di liquidi mediante l'inibizione del riassorbimento di sodio, potassio e cloro. La somministrazione a lungo termine di furosemide nel cane, è dimostrato migliorare la contrattilità cardiaca per riduzione del precarico e quindi diminuzione del rimodellamento vascolare (Borgarelli et al., 2008).

I farmaci ACE-inibitori, tra cui enalapril, benazepril, ramipril ed altri, trovano largo impiego in medicina veterinaria. Questi farmaci agiscono inibendo l'*angiotensin-converting enzyme* (ACE), della cui funzionalità abbiamo discusso in precedenza. L'azione si esprime con aumentata vasodilatazione arteriosa e diuresi.

A seconda della sintomatologia clinica data dalla progressione della patologia e della gravità dell'IP, la terapia deve essere controllata e modificata.

III. TERAPIE DI SUPPORTO

I pazienti con IP spesso necessitano di terapie di supporto in aggiunta al trattamento specifico per l'IP. Tali trattamenti terapeutici prevedono l'ossigenoterapia, il trattamento delle patologie polmonari con farmaci antibiotici, anti-infiammatori (steroidi o non steroidi), agenti broncodilatatori, chemioterapia in caso di neoplasia, e terapia cardiologica, come sopracitato, per i pazienti con insufficienza cardiaca.

Pazienti con patologia tromboembolica possono beneficiare di farmaci antiaggreganti o anticoagulanti, di corticosteroidi, e cani affetti da filariosi cardiopolmonare necessitano di un trattamento mirato all'eliminazione di micro e macro parassiti.

4. CONTRIBUTO SPERIMENTALE

4.1 SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo del presente lavoro è lo studio dei valori di RDW in cani affetti da ipertensione polmonare pre-capillare. Lo scopo è quello di discernere se tale parametro eritrocitario possa avere una valenza clinica nell'approccio diagnostico e terapeutico nella valutazione nei cani affetti da IP pre-capillare.

In questo studio i soggetti presi in esame sono stati suddivisi in quattro gruppi: cani sani, affetti da malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV) senza ipertensione polmonare, affetti da MDVC con ipertensione polmonare post-capillare ed affetti da ipertensione polmonare pre-capillare.

I valori di RDW sono stati messi in relazione a parametri laboratoristici e gli indici ecocardiografici impiegati per la diagnosi dell'IP.

4.2 MATERIALI E METODI

I. POPOLAZIONE

Il protocollo operativo proposto per l'esecuzione del presente studio prospettico è stato sottoposto ed approvato dal *Comitato Etico dell'Università di Padova* (Gennaio 2013 - Numero di Autorizzazione 7084). I soggetti arruolati per lo studio sono cani di proprietà visitati presso l'*Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD)*. Tutti i clienti hanno preso visione e sottoscritto le note informative sull'utilizzo dei dati clinico-anamnestici dei propri cani per lo sviluppo del progetto di ricerca. Sono stati inseriti nel progetto anche cani sani di proprietà di studenti afferenti al nostro Ateneo e di dipendenti del *Dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute (MAPS)*. I dati dei cani presi in considerazione per il nostro progetto sono stati raccolti nel periodo compreso tra Gennaio 2013 e Giugno 2014.

Per l'arruolamento dei casi clinici si richiedeva la disponibilità del proprietario di sottoporre il proprio cane a visita clinica completa, esame radiografico del torace, esame elettrocardiografico (ECG), ecocardiografia (valutazione bidimensionale, M-mode ed eco-Doppler), ed esame emato-biochimico completo. In base al risultato dei test clinici e diagnostici, i cani sono stati suddivisi in 4 gruppi, rispettando i seguenti criteri di inclusione:

- **GRUPPO CONTROLLO:** cani clinicamente sani, con esame radiografico del torace, ECG, ecocardiografia ed eco-Doppler ed esame emato-biochimico completo nei limiti della norma.
- **GRUPPO MDCV NO IP:** cani che presentavano alla visita clinica soffio sistolico apicale sinistro con irradiazione anche sul lato destro del torace. I soggetti erano negativi all'esame sierologico per *Dirofilaria immitis*. L'esame ecocardiografico bidimensionale ed eco-Doppler riportava ispessimento diffuso o nodulare dei lembi mitralici, nonché prolasso dei lembi valvolari, senza alcuna evidenza di

ostruzione nel tratto di efflusso del ventricolo destro. Rigurgito valvolare mitralico da moderato a grave e rigurgito tricuspideale con velocità di picco del rigurgito trans-tricuspideale (TR-Vmax) < 2,8 m/s ed un'insufficienza polmonare, se presente, di lieve entità (< 2,2 m/s) valutate tramite esame eco-Doppler. Cani con MDCV e un rigurgito trans-tricuspideale o insufficienza polmonare non presente o non valutabile, non sono stati inclusi in questo gruppo, poiché la PAP non poteva essere determinata tramite le tecniche ecocardiografiche bidimensionali ed eco-Doppler.

- **GRUPPO MDCV IP:** in questo gruppo sono stati inseriti i cani che presentavano in anamnesi una sintomatologia di grado variabile che in alcuni casi riportava tosse, intolleranza all'esercizio, dispnea anche a riposo, letargia ed alla visita clinica manifestavano soffio sistolico apicale sinistro con irradiazione anche sul lato destro del torace, esame sierologico per *D. immitis* negativo, ed in alcuni casi, tachicardia, tachipnea e rumori respiratori all'auscultazione del torace (rantoli, crepitii, murmure polmonare rinforzato o affievolito). L'esame ecocardiografico bidimensionale dimostrava ispessimento nodulare o diffuso dei lembi valvolari mitralici, prolasso della valvola, rigurgito mitralico di entità da moderata a grave e nessun segno di ostruzione del tratto di efflusso del ventricolo destro. La valutazione della velocità di flusso trans-tricuspideale mediante la metodica eco-Doppler indicava valori superiori a 2,8 m/s (TR-Vmax > 2,8 m/s) corrispondente ad un gradiente di picco sistolico di 31 mmHg. Cani con evidenti patologie polmonari o respiratorie sono stati esclusi dal presente gruppo.
- **GRUPPO IP PRE-CAPILLARE:** soggetti che in anamnesi presentavano con un grado di variabilità individuale episodi sincopali, tosse, letargia, intolleranza all'esercizio e dispnea anche a riposo. Alla visita clinica la sintomatologia generalmente comprendeva segni di dispnea, tachipnea, tachicardia, o ascite nonché all'auscultazione del torace si rilevavano rumori respiratori (rantoli, crepitii, incremento o diminuzione patologici del murmure polmonare) e soffio sistolico

con punto di massima intensità localizzato sul lato destro del torace. All'esame ecocardiografico bidimensionale ed eco-Doppler si rilevava TR-Vmax > 2.8 m/s, escludendo ulteriori possibili patologie del cuore sinistro che potessero essere la causa dell'IP.

II. VALUTAZIONE ECOCARDIOGRAFICA ED ECO-DOPPLER

La valutazione ecocardiografica ed eco-Doppler è stata effettuata in tutti i cani inclusi nello studio, senza sedazione, mediante l'utilizzo di un ecografo commerciale (Zone Ultra, Zonare Medical Systems) equipaggiato con software per esame cardiologico e con sonde *phased-array* con frequenza di emissione pari a 1.0 – 4.0 e 5.0 – 8.0 MHz; durante tutto l'esame è stato monitorato in maniera continua il tracciato elettrocardiografico. Sono stati impiegati i piani di scansione standard per la valutazione ecocardiografica ed eco-Doppler in ogni cane (Thomas et al., 1993).

Le misurazioni dei parametri ventricolari sono state ottenute da immagini M-mode ricavate dalla proiezione parasternale destra. La dimensione dell'atrio sinistro e del diametro dell'aorta sono stati ottenuti tramite la valutazione ecocardiografica bidimensionale da scansioni in asse corto ottenute a livello di radice aortica. La valutazione dei flussi trans-valvolari e misurazione delle velocità di picco sono state eseguite tramite scansione tetra o bicamerale ottenuta dalla finestra parasteranale di sinistra. Di seguito vengono riportati i parametri e gli indici ecocardiografici ed eco-Doppler presi in considerazione in questo studio:

- **LVDD:** diametro ventricolare sinistro in diastole (*left ventricular end diastolic diameter*)
- **LVDS:** diametro ventricolare sinistro in sistole (*left ventricular end systolic diameter*)
- **RVDd:** diametro ventricolare destro in diastole (*right ventricular end diastolic diameter*)
- **Ao:** diametro aortico (*aortic root*)

- **LA**: diametro dell'atrio sinistro (*left atrium*)
- **E peak**: velocità di picco del rigurgito trans-mitralico (*trans-mitralic peak E- wave velocity*)
- **TR-Vmax**: velocità di picco del rigurgito trans-tricuspidale (*trans-tricuspidal regurgitant jet maximal velocity*)

Gli indici ecocardiografici calcolati e presi in considerazione per il nostro studio sono: **LVDd: Ao**, **LVDs: Ao**, **RVDd: LVDd**, **RVDd: Ao** e il rapporto **LA: Ao**.

Tra gli indici includiamo anche **FS%** (*fractional shortening*) che indica la frazione di accorciamento del miocardio ventricolare.

$$(FS\% = ((LVDd - LVDs) / LVDd) \times 100)$$

Nei cani con IP, la pressione arteriosa sistolica polmonare (PASP) è stata calcolata basandosi sul gradiente pressorio tra il ventricolo destro e l'atrio destro.

Tale indice (**Δp**) viene calcolato applicando l'equazione di Bernoulli modificata alla velocità di picco del rigurgito trans-tricuspidale ($\Delta p = 4 \times TRV_{max}^2$), misurata dalla finestra parasternale sinistra apicale con visione tetracamereale. Un valore di TR-Vmax > 2,8 m/sec indica un picco di gradiente sistolico superiore a 31 mmHg, e viene considerato indicativo di IP (Kellihan et al., 2011).

La pressione atriale non è stata compresa nel calcolo di tale indice poiché recenti studi dimostrano che l'aggiunta della pressione atriale stimata al calcolo del gradiente pressorio, può portare ad una sovrastima della gravità dell'IP (Fischer et al., 2009; Kellihan et al., 2011).

III. VALUTAZIONE LABORATORISTICA

I campioni di sangue di tutti i cani arruolati nello studio sono stati esaminati entro le 24 ore dal prelievo, e sono stati eseguiti i profili emocromocitometrico e biochimico sul sangue in K2EDTA e sul siero rispettivamente, prelevati da animali tenuti a digiuno per almeno 12 ore.

Il valore di RDW e gli altri parametri ematologici e biochimici sono stati processati mediante un analizzatore automatico (ADVIA 120 automated CBC, Siemens) e BT 1500 (Biotecnica, Roma, Italia), per l'esame emocromocitometrico e biochimico rispettivamente.

I cani sono stati considerati avere una moderata anemia quando il valore dell'ematocrito era compreso tra 30 % e 37 %, mentre l'anemia è stata considerata grave quando il valore di ematocrito era inferiore a 29 % (Tvedten, 2010).

I cani sono stati considerati azotemici quando i valori di urea erano superiori a 53 mg/dL e di creatinina superiori a 1.2 mg/dL. I soggetti che presentavano rialzo esclusivo della concentrazione plasmatica di urea ma non del valore della creatinina, sono stati considerati avere un'azotemia pre-renale (Nicolle et al., 2007).

Nella Tabella(a) sono riportati parametri laboratoristici considerati ed i valori di riferimento.

Tabella (a): Red Blood Cell Distribution Width (RDW), White Blood Cells (WBC), Emoglobina (HB), Ematocrito (HCT), Volume Corpuscolare Medio (MCV), Piastrine (PLT), Creatinine (Creatinine), Urea (BUN), Proteine Totali (TP).

PARAMETRO EMATOBIOCHIMICO	VALORI DI RIFERIMENTO
RDW (%)	11.9 – 14.5
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	5 - 13
Hb (gr/dL)	12 - 18
Hct (%)	37 – 57
MCV (fL)	59 - 71
Plat ($10^3/\mu\text{l}$)	140 - 400
Creatinine (mg/dL)	0.76 - 1.2
BUN (mg/dL)	27 - 53
Alb (gr/L)	25.3 - 31.8
TP (gr/L)	58 - 69

IV. ANALISI STATISTICA

Per valutare normalità o meno della distribuzione dei dati è stato impiegato il test non parametrico a singolo campione di Kolmogorov-Smirnov.

I dati distribuiti normalmente sono stati riportati come media $\pm$ DS, mentre i dati che non seguivano una distribuzione normale sono stati riportati come mediana e range.

Per analizzare i dati continui con distribuzione normale (Hb, Hct, MCV, Plat, TP, FA%, LVDd:Ao, LVDs:Ao, TR-Vmax, Δp), è stato utilizzato il test ANOVA a una via, e successivamente elaborate mediante il Tukey's multiple comparisons test.

Le variabili biologiche quali peso ed età risultavano anch'esse distribuite normalmente. Per le variabili distribuite non normalmente è stato applicato il test non-parametrico Kruskal-Wallis (RDW, WBC, urea, creatinine, RVDd:Ao, LA:Ao and E-peak).

Per la valutazione della correlazione e dei coefficienti di correlazione tra il valore di RDW w gli altri parametri laboratoristici ed ecocardiografici, sono stati applicati il test di Pearson o il test di Spearman per le variabili distribuite normalmente o non normalmente rispettivamente.

Tutte le analisi statistiche sono state ottenute mediante l'utilizzo di un software per l'elaborazione statistica (SAS 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.).

Il livello di significatività scelto corrisponde ad un valore $P < 0.05$.

4.3 RISULTATI

I. STUDIO DI POPOLAZIONE

Nello studio sono stati inclusi 157 cani di razze differenti, di cui 81 cani erano di sesso maschile e 76 femminile. Tra questi soggetti il gruppo di cani sani (CONTROLLO) annoverava 39 cani, mentre tra cani con malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV) 51 soggetti non presentavano ipertensione polmonare (MDCV NO IP), e 43 cani invece presentavano MDCV associata ad ipertensione polmonare (MDCV IP) (Tabella 1).

Nel gruppo dei cani con ipertensione polmonare pre-capillare sono stati reclutati 24 soggetti (IP pre-capillare). I cani con MDCV con e senza IP e quelli con IP pre-capillare sono risultati essere significativamente più anziani rispetto ai cani sani ($P < 0.001$).

I cani con MDCV con e senza IP e il gruppo di cani con IP pre-capillare presentavano un peso corporeo significativamente inferiore ai cani del gruppo CONTROLLO ($P < 0.05$, $P < 0.001$ e $P < 0.05$ rispettivamente).

Tra le razze dei cani con MDCV ed IP maggiormente rappresentate sono state le razze di piccola taglia, di cui tre soggetti appartenenti alle razze Bassotto Tedesco, Schnauzer Nano e Jack Russell Terrier, nonché venticinque cani meticci.

Nel gruppo dei cani con IP pre-capillare undici cani erano meticci, nove cani appartenevano a razze di piccola taglia (tre di razza Yorkshire terrier, due cani Shitzu e due di razza Bulldog Francese, un Pechinese ed un Cavalier King Charles Spaniel).

Tra i cani appartenenti al gruppo ipertensione polmonare pre-capillare, la patologia più rappresentata è stata la filariosi cardiopolmonare da *Dirofilaria Immitis* di cui erano affetti sei cani (classificazione clinica IP *gruppo 1*), undici cani manifestavano ipertensione polmonare da patologie tromboemboliche acute o croniche, tra cui quattro cani con endocardite batterica e sette cani con tromboembolismo polmonare (dall'inglese

pulmonary thromboembolism, PTE) (classificazione clinica IP *gruppo 4*), cinque cani presentavano patologia polmonare cronica o acuta, tra cui due con broncopneumopatia cronica ostruttiva e due con fibrosi polmonare (classificazione clinica IP *gruppo 3*). Un soggetto presentava IP determinata da compressione dell'arteria polmonare dovuta ad un tumore della base del cuore (classificazione clinica IP *gruppo 5*). In un unico soggetto, non appartenente a nessuna delle razze con predisposizione ad IP idiopatica ed escluse tutte le possibili cause cardiache, presentava una condizione di ipertensione polmonare la cui eziologia non è stata confermata.

Una moderata anemia è stata riscontrata in una piccola percentuale di cani del gruppo MDVD IP ($n= 1/43$, 2.4%) e in cani del gruppo IP pre-capillare ($n= 2/24$, 8.3%). Una condizione di azotemia è stata evidenziata nel 31% ($n= 13/43$) dei cani del gruppo MDCV IP, e nel 56.5% ($n= 13/24$) di cani appartenenti al gruppo IP pre-capillare: tale condizione si è rivelata essere azotemia pre-renale nella maggior parte dei casi (69.2% e 84.6% rispettivamente).

Un singolo soggetto del gruppo IP pre-capillare ($n= 1/24$, 4.2%) ha riportato contemporaneamente sia di una condizione di anemia che di azotemia (Hct= 21.1 % e BUN= 67 mg/dL), con valore di creatinina nei range di normalità (Creatinine = 0.91 mg/dL).

II. VARIABILI LABORATORISTICHE ED ECOCARDIOGRAFICHE

Tra le variabili laboratoristiche considerate la mediana del valore di WBC è risultata essere significativamente più alta in soggetti del gruppo MDCV IP ($11.4 \times 10^3/\mu\text{l}$ (range 6.3-34.0), $P < 0.01$) e del gruppo IP pre-capillare ($17.1 \times 10^3/\mu\text{l}$ (range 6.2-41.0), $P < 0.001$) rispetto al gruppo di controllo ($9.20 \times 10^3/\mu\text{l}$, range 5.1-18.9). La stessa variabile è risultata essere significativamente più alta in cani del gruppo MDCV IP ($P < 0.05$) e del gruppo IP pre-capillare ($P < 0.001$) rispetto ai cani del gruppo MDCV NO IP ($10 \times 10^3/\mu\text{l}$, range 4.7-22.7).

La mediana della concentrazione plasmatica di urea (BUN) è risultata significativamente più alta nei soggetti dei gruppi MDCV NO IP (13.9 mg/dL, range 5.4-78.5), MDVC IP (14.6 mg/dL, range 6.1-64.3) e nei cani del gruppo IP pre-capillare (22.1 mg/dL, range 8.7-81.2), rispetto ai cani del gruppo CONTROLLO (10.3 mg/dL, range 3.7-21.8) ($P < 0.001$ per ognuno di essi), così come la mediana della concentrazione di urea nel gruppo IP pre-capillare era significativamente più elevata rispetto al gruppo di cani MDCV NO IP ($P < 0.001$).

Non sono state riscontrate altre differenze statisticamente significative in merito agli altri parametri laboratoristici valutati.

Per quanto concerne i parametri ecocardiografici ed eco-Doppler considerati per la valutazione della morfologia e della funzionalità del cuore sinistro, i cani appartenenti al gruppo MDCV IP presentavano indici cardiaci, quali LVDd:Ao, LVDs:Ao, LA:Ao ed E-max, significativamente più elevati rispetto ai cani del gruppo CONTROLLO ($P < 0.001$ per ognuno di essi), e rispetto ai cani del gruppo MDCV NO IP ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.001$ e $P < 0.001$ rispettivamente).

I cani del gruppo IP pre-capillare hanno mostrato un indice del diametro del ventricolo sinistro in diastole comparato al diametri dell'aorta (LVDd:Ao) significativamente inferiore

rispetto ai gruppi MDCV NO IP e MDCV IP ($P < 0.001$ per entrambi i gruppi); l'indice del diametro del ventricolo sinistro in sistole comparato al diametro dell'aorta (LVDs:Ao) ha riportato valori inferiori rispetto ai gruppi CONTROLLO, MDCV NO IP e MDCV IP ($P < 0.05$, $P < 0.001$ e $P < 0.001$ rispettivamente). Il gruppo IP pre-capillare inoltre ha mostrato valori del rapporto del diametro dell'atrio sinistro comparato al diametro aortico (LA:Ao) inferiori rispetto al gruppo MDCV IP ($P < 0.001$) ed una minore velocità di rigurgito trans-mitralico (E-max) rispetto al gruppo CONTROLLO, MDCV NO IP e MDCV IP ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$ rispettivamente).

I parametri di valutazione morfologica e funzionale del cuore destro hanno riportato che il rapporto tra le due camere ventricolari in diastole (LVDd:RVDd) risulta essere significativamente più elevato in cani del gruppo IP pre-capillare rispetto al gruppo CONTROLLO ($P < 0.05$), al gruppo MDCV NO IP ($P < 0.001$) ed al gruppo MDCV IP ($P < 0.001$).

Il gruppo di cani con IP pre-capillare hanno dimostrato una velocità di picco del rigurgito trans-tricuspidale (TR-Vmax) ed una conseguente pressione arteriosa sistolica polmonare (PASP) significativamente maggiori rispetto ai cani del gruppo MDCV NO IP e del gruppo MDCV IP ($P < 0.001$ per entrambi i parametri) (Tabella 2).

III. RDW

Nei cani sani del gruppo CONTROLLO, la mediana ed il range del valore di RDW era di 13.10 % (11.8-14.5). Valori di RDW superiori al limite di riferimento (14.5%) sono stati riscontrati in sei dei 51 cani con MDCV NO IP (11.3%), otto cani dei 43 del gruppo MDCV IP (18.6 %) e nove dei 24 cani del gruppo IP pre-capillare (37.5 %). Nel gruppo di cani con IP pre-capillare, tra i soggetti che presentavano un valore di RDW superiore al limite di riferimento, quattro cani erano affetti da patologie polmonari croniche, tre cani riportavano IP pre-capillare la cui causa era PTE, un cane con endocardite batterica ed un soggetto la cui causa di ipertensione polmonare non è stata determinata, avendo escluso tutte le cause di tipo cardiaco ed appurato che il soggetto non appartenesse ad una delle razze in cui l'IP è risultata essere di origine idiopatica. La mediana ed il range di RDW nei gruppi di cani MDCV IP (13.6%, range 11.7-17.6%) e MDCV NO IP (13.5 %, range 11.2- 16.6 %) erano significativamente più alti rispetto al gruppo di cani sani ($P < 0.05$ per entrambi i gruppi). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i valori di RDW ottenuti nei gruppi di cani con IP pre-capillare e cani con MDCV NO IP ($P = 0.053$) né con i cani del gruppo MDCV IP ($P = 0.082$). I risultati sono riportati nella Tabella 2 e nella Figura 1.

Nell'analisi del valore di RDW tra tutti i gruppi, esso è risultato essere debolmente e positivamente correlato all'età ($P < 0.001$, $\rho = 0.282$), al valore dei globuli bianchi (WBC) ($P < 0.001$, $\rho = 0.282$) ed alla concentrazione plasmatica di urea. Nessuna correlazione è stata riscontrata tra il valore di RDW ed il peso corporeo né con le altre variabili laboratoristiche considerate. Il valore di RDW ha dimostrato una debole e positiva correlazione con la variabile TR-Vmax e con il gradiente di pressione arteriosa sistolica polmonare (Δp , PASP) ($P < 0.01$, $\rho = 0.238$ per entrambe le variabili). Non sono state riscontrate ulteriori correlazioni tra il valore di RDW e gli altri parametri ed indici ecocardiografici ed eco-Doppler considerati (Tabella 3).

Tabella 1: Dati demografici relativi a 157 cani inclusi nello studio.

	CONTROLLO (n = 39)	MDCV NO IP (n = 52)	MDCV IP (n = 42)	IP pre-capillare (n = 24)	P
Età (anni)	6.4 ± 2.8	10.2 ± 3.8**	11.8 ± 2.1**,#	11.7 ± 3.6**	<0.001
Peso (kg)	19.4 ± 11.3	13.8 ± 11.1*	10.7 ± 5.4**	12.5 ± 7.8*	<0.001
Sesso (♂/♀)	16/23	29/23	27/15	9/15	0.085

CONTROLLO, cani sani; MDCV, malattia degenerative cronica valvolare; MDCV NO IP, malattia degenerativa cronica valvolare non associata ad ipertensione polmonare; MDCV IP, malattia degenerativa cronica valvolare associata ad ipertensione polmonare; IP pre-capillare, ipertensione polmonare pre-capillare.

* $P < 0.05$ paragonata al gruppo di CONTROLLO.

** $P < 0.001$ paragonata al gruppo di CONTROLLO.

$P < 0.05$ paragonata al gruppo MDCV NO IP.

I dati sono espressi come media ± deviazione standard (DS).

Tabella 2: Parametri laboratoristici ed ecocardiografici dei 157 cani arruolati nello studio.

Variabile	MDCV				P
	CONTROLLO (n = 39)	MDCV NO-IP (n = 51)	MDCV-IP (n = 43)	IP pre-capillare (n = 24)	
Ematologia					
RDW (%)	13.1 (11.8-14.5)	13.6 (11.7-17.6)*	13.5 (11.2-16.6)*	14.0 (11.3-22.4)***	0.004
WBC (10 ³ /μl)	9.20 (5.1-18.9)	10 (4.7-22.7)	11.4 (6.3-34.0)**†	17.1 (6.2-41.0)*****††	<0.001
Hct (%)	49.3 ± 4.3	45.8 ± 7.0*	47.4 ± 5.7	46.4 ± 8.0	0.036
Hb (g/dL)	167 ± 16	156 ± 25	159 ± 19	155 ± 29	0.064
MCV (fL)	68.0 ± 3.9	68.1 ± 4.3	68.5 ± 3.4	68.8 ± 4.5	0.067
PLT (10 ³ /μl)	313 ± 113	369 ± 131	417 ± 152	368 ± 151	0.115
Biochimica					
BUN (mg/dL)	10.3 (3.7-21.8)	13.9 (5.4-78.5)***	14.6 (6.1-64.3)***	22.1 (8.7-81.2)*****†	<0.001
Creatinine (mg/dL)	84.0 (39.8-123.8)	84.9 (53.0-253.7)	80.4 (46.9-328.9)	83.1 (38.9-169.7)	0.737
TP (g/L)	65.0 ± 4.5	62.3 ± 6.8	62.4 ± 8.4	65.4 ± 11.9	0.269
Ecocardiografia ed Eco-Doppler					
LVDd: Ao	1.70 ± 0.41	2.02 ± 0.38	2.55 ± 0.59*****††	1.15 ± 0.72*****††###	<0.001
LVDs: Ao	1.06 ± 0.28	1.22 ± 0.27	1.40 ± 0.35****†	0.76 ± 0.48*†††###	<0.001
LA: Ao	1.37 (0.90-1.58)	1.51 (0.96-3.00)***	2.12 (1.05-4.26)*****††	1.32 (0.9-1.79)###	<0.001
FS (%)	35 ± 6	39 ± 9	44 ± 9*	41 ± 13	0.024
E-max (m/s)	0.74 (0.49-1.09)	0.75 (0.45-1.47)	1.22 (0.29-.15)*****††	0.57 (0.3-0.97)*†††###	<0.001
RVDd: LVDd	0.25 (0.10-1.00)	0.20 (0.06-0.44)	0.14 (0.06-0.65)*	0.38 (0.10-1.69)*†††###	<0.001
RVDd: Ao	0.44 (0.21-0.88)	0.41 (0.15-0.93)	0.37 (0.12-1.47)	0.23 (0.06-2.25)	0.57
TR Vmax (m/s)	ND	2.07 ± 0.54	3.43 ± 0.49†††	4.15 ± 0.80†††###	<0.001
Δp (PASP) (mmHg)	ND	18.9 ± 7.7	48.2 ± 14.5†††	71.5 ± 27.9†††###	<0.001

RDW, Red blood cell distribution width; WBC, White blood cells; Hct, ematocrito; Hb, emoglobina; MCV, Volume Corpuscolare Medio; PLT, piastrine; BUN, urea; Creatinine, creatinine; TP, proteine totali; LVDD, Left ventricular diameter at diastole; Ao, Aortic diameter; LVDs, Left ventricular diameter at systole; LA, left atrial diameter; FS, Fractional shortening; E-max, velocità di picco del rigurgito trans-mitralico; RVDd, Right ventricular diameter at diastole; TR Vmax, velocità di picco del rigurgito trans-tricuspidale; Δp (PASP), pressione arteriosa sistolica polmonare; n, Numero di cani; MDCV NO IP, malattia degenerativa cronica valvolare non associate ad ipertensione polmonare; MDVD IP, ipertensione polmonare associata a MDCV;

* $P < 0.05$ con il gruppo CONTROLLO; ** $P < 0.01$ con il gruppo CONTROLLO; *** $P < 0.001$ con il gruppo CONTROLLO; † $P < 0.05$ con cani con malattia degenerative cronica valvolare senza ipertensione polmonare (MDCV NO IP); †† $P < 0.01$ con il gruppo MDCV NO IP; ††† $P < 0.001$ con il gruppo MDCV NO IP;

$P < 0.05$ con cani con malattia degenerative cronica valvolare ed ipertensione polmonare (MDCV IP); ## $P < 0.01$ con il gruppo MDCV IP; ### $P < 0.001$ con il gruppo MDCV IP.

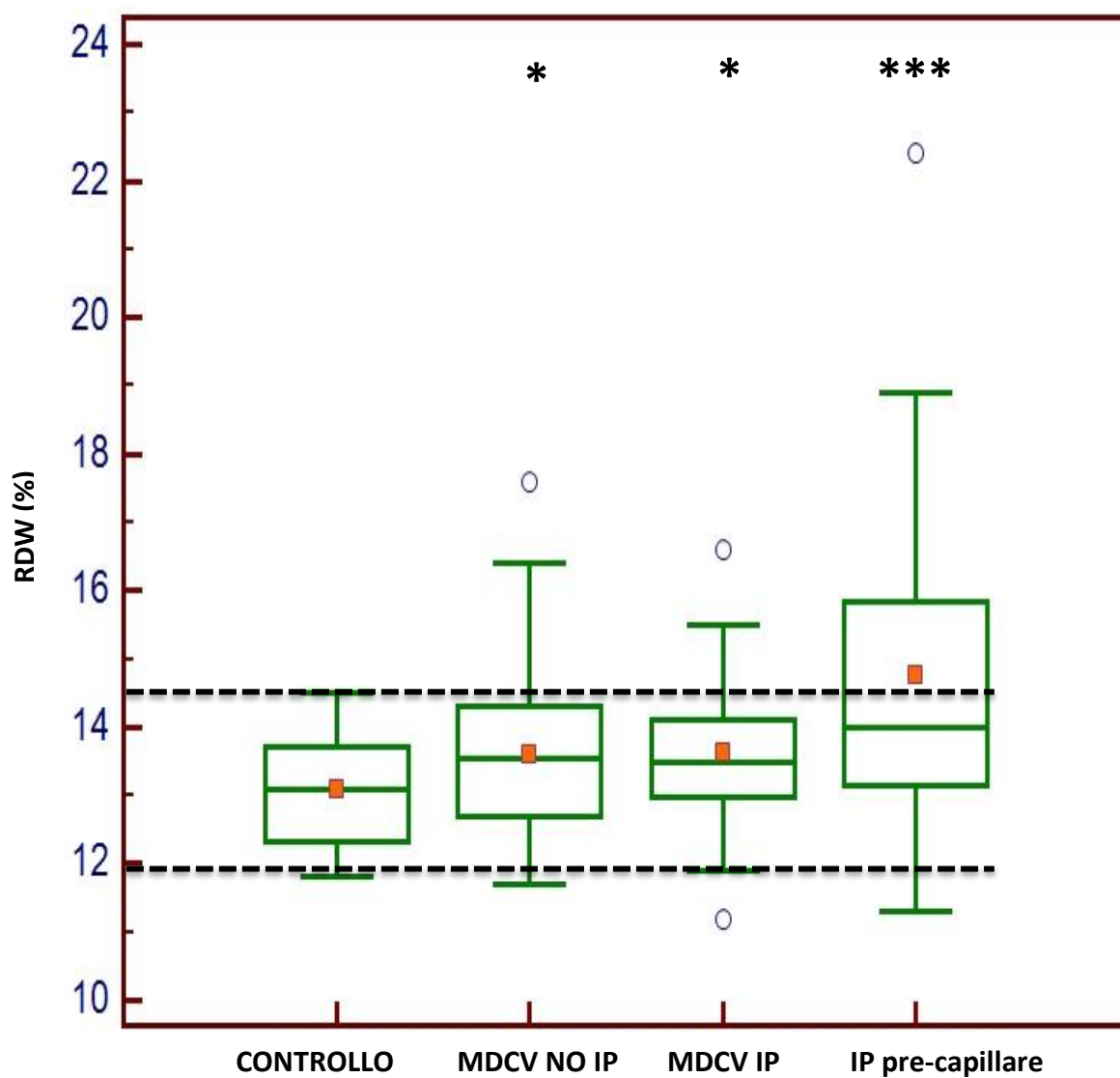
I dati con distribuzione normale sono espressi come media ± DS, mentre i dati distribuiti non normalmente sono espressi come mediana e range.

Tabella 3: Correlazioni tra dati demografici, laboratoristici ed ecocardiografici ed il valore di RDW.

Variabile	N. di cani	Coefficiente di correlazione	P
Età	157	0.282	<0.001
Peso	157	-0.041	0.0631
Hct	157	-0.153	0.056
Hb	157	-0.152	0.058
MCV	157	-0.103	0.202
WBC	157	0.282	< 0.001
PLT	157	0.059	0.467
BUN	157	0.299	< 0.001
Creatinine	157	0.025	0.761
TP	157	-0.151	0.065
LVDd: Ao	157	0.036	0.667
LVDs: Ao	157	0.073	0.363
LA: Ao	157	0.116	0.153
FS	157	-0.048	0.555
E-max	157	-0.073	0.363
RVDd: LVDd	157	0.011	0.909
RVDd: Ao	157	-0.031	0.743
TR Vmax	118	0.238	0.010
Δp (PASP)	118	0.238	0.010

Hct, ematocrito; Hb, emoglobina; MCV, Volume Corpuscolare Medio; WBC, White blood cells; PLT, piastrine; BUN, urea; Creatinine, creatinine; TP, protein totali; LVDd, Left ventricular end diastolic diameter; Ao, Aortic diameter; LVDs, Left ventricular end systolic diameter; LA, Left atrial diameter; FS, Fractional shortening; E-max, velocità dei picco del rigurgito trans-mitralico; RVDd, Right ventricular end diastolic diameter; TR Vmax, velocità di picco del rigurgito trans-tricuspidale; Δp (PASP), Gradiente pressorio (Pressione arteriosa sistolica polmonare).

Figura 1: Box and whisker plots dei valori di RDW ottenuti da 39 cani sani (CONTROLLO), 51 cani con malattia degenerativa cronica valvolare non associate ad ipertensione polmonare (MDCV NO IP), 43 cani con malattia degenerativa cronica valvolare associata ad ipertensione polmonare (MDCV IP), e 24 cani con ipertensione polmonare pre-capillare (IP pre-capillare).



I box rappresentano il range interquartile (dal 25° al 75° percentile), le barre orizzontali all'interno di ogni box rappresentano i valori delle mediane, i whisker rappresentano il 5° ed il 95° percentile, i valori fuori estremamente fuori range sono rappresentati rispettivamente come piccoli cerchi vuoti. L'intervallo di riferimento del valore di RDW è rappresentato dalle linee tratteggiate.

* Differenze statisticamente significative con i cani del gruppo di controllo ($P < 0.05$);

*** Differenze statisticamente significative con i cani del gruppo di controllo ($P < 0.001$).

4.4 DISCUSSIONE

In questo studio prospettico osservazionale, il valore di RDW e di altri parametri laboratoristici sono stati valutati in cani con ipertensione polmonare pre-capillare ed in cani con ipertensione polmonare post-capillare conseguente a malattia degenerativa cronica valvolare.

Cani sani e cani con malattia degenerativa cronica valvolare senza evidenze di ipertensione polmonare diagnosticata mediante metodica Doppler, sono stati considerati come gruppi di controllo.

I risultati di questo studio hanno dimostrato che i valori di RDW sono elevati in condizioni di ipertensione polmonare pre-capillare (IP pre-capillare) ed ipertensione polmonare post-capillare da malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV IP); l'aumento del valore di RDW nei due gruppi di patologie sopracitate non risulta essere correlato ai livelli di ematocrito (Hct), emoglobina (Hb) e volume corpuscolare medio (MCV).

Il valore di RDW è risultato essere positivamente e debolmente correlato alla pressione arteriosa sistolica polmonare (PASP) ricavata mediante misurazioni eco-Doppler.

Il gruppo di cani con IP pre-capillare ha riportato indici ecocardiografici di morfologia e funzionalità del cuore sinistro (LVDd:Ao, LVDs:Ao ed E-max) significativamente inferiori rispetto agli altri tre gruppi, mentre l'indice RVDd:LVDd significativamente superiore anch'esso rispetto a tutti gli altri tre gruppi. Inoltre nel gruppo di cani con IP pre-capillare abbiamo riscontrato un elevato valore di TR-Vmax e di conseguenza una maggior gradiente di PASP, rispetto ai cani con MDCV.

Questi risultati suggeriscono che in cani con ipertensione polmonare pre-capillare ci si possa aspettare una ridotta funzionalità del cuore sinistro, e ciò conferma che nel cane la condizione di ipertensione polmonare pre-capillare è solitamente correlata ad un maggior aumento della pressione arteriosa polmonare rispetto alla condizione di ipertensione polmonare post-capillare (Jonson et al., 1999; Pyle et al., 2004; Guglielmini et al., 2010). Il

valore di RDW inoltre, risulta essere positivamente correlato a TR-Vmax , indicando che esiste una seppur debole correlazione tra l'anisocitosi e la gravità della condizione di ipertensione polmonare.

In cani del gruppo MDCV IP è stato riscontrato un aumento significativo di alcuni indici ecocardiografici, tra cui gli indici delle dimensioni atriali, dei diametri ventricolari sia sistolico che diastolico e di E-max, rispetto ai cani del gruppo MDCV NO IP: questi parametri risultano essere associati ad una peggior prognosi in cani con MDCV (Borgarelli et al., 2008; Borgarelli et al., 2012; Hezzell et al., 2012). Questi reperti risultano essere concordi con ciò che viene riportato in letteratura, ossia che la condizione di ipertensione polmonare post-capillare nel cane conseguente a MDCV si sviluppi in stadi avanzati della malattia cardiaca (Serres et al., 2006; Chiavegato et al., 2009; Guglielmini et al., 2010).

Nei cani del gruppo MDCV associata o meno ad IP, e del gruppo IP pre-capillare il valore di RDW è risultato superiore a quello del gruppo CONTROLLO: approssimativamente un quinto dei cani del gruppo MDCV IP ed più di un terzo dei cani del gruppo IP pre-capillare, hanno registrato valori di RDW superiori al range di riferimento. Nello specifico, elevati valori di RDW sono stati riscontrati in cani con IP pre-capillare associata a patologie broncopolmonari croniche, PTE ed endocarditi batteriche. Allo stesso modo, in medicina umana sono riportati elevati valori di RDW in pazienti con patologie polmonari (classificazione clinica IP *gruppo 3*) (Sincer et al., 2012; Nathan et al., 2013; McLaughlin et al., 2009), patologie ostruttive vascolari o eventi tromboembolici polmonari acuti o cronici (classificazione clinica IP *gruppo 4*)(Zorlu et al., 2012; Ozsu et al., 2014; Rubin et al., 2006; Xi et al., 2014),ed endocarditi settiche (Guray et al., 2014).

Il meccanismo fisiopatologico responsabile dell'associazione tra il valore di RDW e le patologie cardiovascolari, in particolare tra RDW ed ipertensione polmonare e malattie tromboemboliche, risultano ancora oggi poco chiari (Hampole et al., 2009; Rhodes et al., 2011; Montagnana et al., 2012).

In medicina umana non si è ancora completamente chiarito se il parametro RDW sia un indipendente fattore di rischio cardiovascolare oppure possa essere un indice di concomitanti processi patologici, come ad esempio processi infiammatori o autoimmuni

che influenzino il processo di maturazione eritrocitaria, patologie renali croniche e conseguente ridotta produzione di eritropoietina, deficienze alimentari o sindromi da malassorbimento (deficienza di vitamina B12, ferro, folati), oppure essere associato a danni ossidativi (Sánchez-Chaparro et al., 2010; Tonelli et al., 2008; Förhécz et al., 2009; Hampole et al., 2009; Montagnana et al., 2012).

L'elevato valore di WBC che è stato riscontrato nel presente studio in cani con ipertensione polmonare pre-capillare ed ipertensione polmonare post-capillare (gruppo MDCV IP), ed analogamente la correlazione positiva tra il valore di RDW ed il valore di WBC, suggerisce che un processo infiammatorio e /o un danno ossidativo sia associato alla condizione di ipertensione polmonare nel cane: tale reperto risulta concorde con quanto riportato in letteratura umana (Montagnana et al., 2012; Rhodes et al., 2011).

Un aumento della concentrazione sierica dell'urea ma non di quella della creatinina è stata riscontrata in cani con MDCV con e senza ipertensione polmonare, ed in cani con ipertensione polmonare pre-capillare: è stata inoltre osservata una correlazione positiva tra il valore di RDW e la concentrazione di urea sierica.

L'azotemia ha dimostrato avere un prevalenza di 31% in cani del gruppo MDCV IP e del 56% in cani del gruppo IP pre-capillare: la maggior parte di questi animali presentavano una condizione di azotemia pre-renale, ed una condizione di anemia associata all'azotemia è stata riscontrata solo in un cane (2.4 %) appartenente al gruppo IP pre-capillare ed in nessun cane con MDCV associata ad IP.

Diversi studi sono stati condotti ad indagare biomarker cardiaci specifici in cani con ipertensione polmonare tra cui la valutazione della concentrazione sierica di troponina cardiaca I (dall'inglese *cardiac Troponin I*, cTnI) in cani con ipertensione polmonare pre-capillare ed ipertensione polmonare post-capillare da MDCV (Guglielmini et al., 2010), la concentrazione del peptide natriuretico atriale (dall'inglese *N-terminal-pro-atrial natriuretic peptide*, NT-pro-ANP) e la concentrazione sierica del peptide natriuretico cerebrale tipo B (dall'inglese *N-terminal-pro-brain natriuretic peptide*, NT-pro-BNP) in cani con ipertensione polmonare pre-capillare (Kellihan et al., 2011), ed la concentrazione di NT-pro-BNP in cani con ipertensione polmonare conseguente a malattia degenerativa

cronica valvolare (Atkinson et al., 2009). Un recente studio ha valutato la concentrazione di NT-pro-BNP ed NT-pro-ANP in cani in cui è stata indotta sperimentalmente una condizione di ipertensione polmonare (Hori et al., 2012).

A causa delle diverse tipologie di *study design* e delle popolazioni di cani oggetto di questi studi, non è emersa un'omogeneità dei risultati ottenuti; nonostante ciò che viene generalmente riconosciuto è un aumento dei valori dei peptidi natriuretici (NT-pro-BNP e NT-pro-ANP) e della cTnI in cani con ipertensione polmonare pre-capillare, in particolare in cani in cui la condizione di IP è molto grave e/o determinata da PTE.

I risultati del presente studio ampliano la valutazione dei sopracitati biomarker cardiaci suggerendo che come il danno miocardico, lo stress da sovradistensione volumetrica delle pareti delle camere cardiache e lo stress ossidativo, così l'anisocitosi è un reperto che può essere evidenziato in cani con ipertensione polmonare.

In medicina umana, la valutazione di RDW viene attualmente considerato superiore a quella della concentrazione sierica di NT-pro-BNP in quanto risulta essere un affidabile marker prognostico in pazienti con ipertensione polmonare: questo suggerisce che la valutazione di RDW, in quanto parametro dell'esame emocromocitometrico routinariamente misurato dai moderni analizzatori contaglobuli, possa essere un'alternativa più immediata e meno costosa rispetto alla valutazione dei peptidi natriuretici (in particolare di NT-pro-BNP) nell'approccio diagnostico nei pazienti con ipertensione polmonare (Hampole et al., 2009; Rhodes et al., 2011).

Esistono alcune limitazioni a questo studio. La prima riguarda il fatto che sono stati inclusi soggetti di razza diversa e la maggior parte degli animali erano di razza meticcia, in particolare nel gruppo MDCV IP e IP pre-capillare. Le variazioni di RDW legate alla razza non possono essere completamente escluse, poiché sono stati riportati valori di RDW superiori al range di riferimento in cani sani di razza Schnauzers Nano o Medio in cui si è riscontrata una stomatocitosi di tipo ereditario (Brown et al., 1994; Bonfanti et al., 2004). In questo studio si precisa che tre soggetti di razza Schnauzers Nano sono stati inclusi nel

gruppo MDCV IP, ma nessuno di questi presentava valori di RDW al di fuori dal range di normalità.

In secondo luogo, il gruppo di cani sani ha subito un test di crossmatch con i cani del gruppo MDCV IP e del gruppo IP pre-capillare valutando influenze del genere degli animali, ma non di età e di peso corporeo; non si può escludere completamente che il peso corporeo e l'età possano aver influito sul valore di RDW riscontrato in questi animali. Ad ogni modo, non sono state riportate associazioni tra il valore di RDW ed il peso corporeo né in questo studio, né in letteratura (Guglielmini et al., 2013).

Nel presente studio inoltre la diagnosi di IP è stata emessa a seguito della valutazione ecocardiografiche ed eco-Doppler della velocità dei flussi trans-tricuspidale (TR-Vmax): per nessuno dei cani inclusi nello studio è stato effettuato cateterismo del cuore destro per la misurazione della pressione cardiaca con metodo invasivo. La valutazione eco-Doppler per la determinazione di TR-Vmax è la tecnica più comunemente utilizzata e riportata nella pratica clinica per la diagnosi di ipertensione polmonare nel cane (Borgarelli, 2014). La presenza di IP è stata considerata come altamente improbabile in pazienti clinicamente sani, senza alcun reperto radiografico ed ecocardiografico di patologie cardio-respiratorie.

La diagnosi di PTE nei cani con IP pre-capillare in questo studio si è basata sui rilievi clinici, radiografici ed ecocardiografici ed in alcuni casi l'esame necroscopico, ma non sono state utilizzate tecniche avanzate di diagnostica per immagini (come ad esempio l'angiografia, la tomografia computerizzata o la scintigrafia). Queste tecniche non sono spesso disponibili ed a volte rischiose in particolare nei pazienti critici poiché richiedono una sedazione profonda o un'anestesia: la diagnosi di PTE viene quindi verosimilmente emessa in seguito a rilievi clinici, radiografici, ecocardiografici ed avendo escluso le ulteriori possibili cause di diversa eziologia (Hackner, 2009).

In fine, i cani inclusi in questo studio erano pazienti riferiti da colleghi o da altre strutture veterinarie ed alcuni di questi ricevevano una terapia per le patologie cardiache e/o polmonari al momento dell'inclusione nello studio: gli effetti di tali trattamenti farmacologici non possono essere determinati.

4.5 CONCLUSIONI

L'aumento del valore di RDW osservato nei cani con ipertensione polmonare, in particolare nei cani con ipertensione polmonare pre-capillare, e la correlazione tra RDW ed il gradiente pressorio arterioso polmonare valutato mediante metodica eco-Doppler (PASP), suggerisce una possibile relazione tra il fenomeno dell'anisocitosi e la condizione di ipertensione polmonare nel cane.

Elevati valori di RDW sono risultati essere associati alla presenza di un processo infiammatorio ed ad una condizione di iperazotemia pre-renale nei cani con ipertensione polmonare.

Il valore di RDW è un parametro facilmente valutabile, poco costoso e routinariamente compreso nell'esame emocromocitometrico, e può offrire dei vantaggi rispetto alla più costosa e meno immediata valutazione di altri biomarker vascolari.

Per queste ragioni, si evince che l'utilità della valutazione di RDW nella pratica clinica e nella diagnostica dell'ipertensione polmonare e nelle patologie cardio-respiratorie nel cane, merita ulteriori studi prospettici. In particolare il valore clinico e prognostico di RDW in cani con ipertensione polmonare necessita di più approfondite valutazioni.

5. BIBLIOGRAFIA

Ani C e Ovbiagele B (2009). Elevated red blood cell distribution width predicts mortality in persons with known stroke. *J Neurol Sci.* **277**:103 –108.

Atkinson KJ, Fine DM, Thombs LA, Gorelick JJ, Durham HE (2009). Evaluation of pimobendan and N-terminal probrain natriuretic peptide in the treatment of pulmonary hypertension secondary to degenerative mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med.* **23**:1190-96.

Bach JF, Rozanski EA, MacGregor J, et al (2006). Retrospective evaluation of sildenafil citrate as a therapy for pulmonary hypertension in dogs. *J Vet Intern Med.* **20**:1132-35.

Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S (2004). Diagnosis and Differential Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Coll Cardiol.* **43**(12) Suppl S.

Bazick HS, Chang D, Mahadevappa K, Gibbons FK, Christopher KB (2011). Red cell distribution width and all-cause mortality in critically ill patients. *Crit Care Med* **39**:1913 – 21.

Kaplan NM. (2011). Systemic hypertension: Treatment. In: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P, eds. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 9th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier. Cap **46**.

Beghetti M e Galié N (2009). Eisenmenger syndrome: a clinical perspective in a new therapeutic era of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* **253**:733-40.

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

Bonderman D, Wilkens H, Wakounig S, Schafers HJ, Jansa P, Lindner J, Simkova I, Martischnig AM, Dudczak J, Sadushi R, SkoroSajer N, Klepetko W (2009). Lang IM. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* **33**:325-31.

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

Borgarelli M, Crosara S, Lamb K, Savarino P, La Rosa G, Tarducci A, Haggstrom J (2012). Survival characteristics and prognostic variables of dogs with preclinical chronic degenerative mitral valve disease attributable to myxomatous degeneration. *J Vet Intern Med.* **26**: 69–75.

Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, Santilli RA, Chiavegato D, Poggi M, Bellino C, La Rosa G, Zanatta R, Haggstrom J, Tarducci A (2008). Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med.* **22**:120-128.

Borgarelli M, Zini E, D'Agnolo G, Tarducci A, Santilli RA, Chiavegato D, Tursi M, Prunotto M, Haggstrom J (2004). Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. *J Vet Cardiol.* **6**:25–31.

Borgarelli, M (2014). Pulmonary hypertension. In: Bonagura J.D. and Twedt D.C. (Eds.), *Kirk's Current Veterinary Therapy XV*. Elsevier Saunders, St. Louis, MO, USA, pp. 711-717.

Braam B, Cupples WA, Joles JA, Gaillard C. (2012). Systemic arterial and venous determinants of renal hemodynamics in congestive heart failure. *Heart Fail Rev.* **17**(2):161-75.

Braunwald E (2008). Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med.* **358**:2148-59.

Brown DE, Weiser MG, Thrall MA, Giger U, Just CA (1994). Erythrocyte indices and volume distribution in a dog with stomatocytosis. *Vet Pathol.* **31**:247-250.

Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Ranisio M, Bodin, Rubin LG (2001). Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet.* **358**:1119-23.

Chetboul V, Serres F, Tissier, Lefebvre HP, Carlos Sampedrano C, Gouni V, Poujol L, Hawa G e Pouchelon JL. (2009). Association of Plasma N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Concentration with Mitral Regurgitation Severity and Outcome in Dogs with Asymptomatic Degenerative Mitral Valve Disease. *J Vet Intern Med.* **23**:984–994.

Chiavegato D, Borgarelli M, D’Agnolo G, Santilli RA (2009). Pulmonary hypertension in dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *Vet Radiol Ultrasoun.* **50**:253-258.

Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard, Groves BM, Loyd JE (1992). An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* **327**:70-75.

DeFrancesco TC, Rush JE, Rozanski EA, Handen BD, Keene BW, Moore DT, Atkins CE (2007). Prospective Clinical Evaluation of an ELISA B-Type Natriuretic Peptide Assay in the Diagnosis of Congestive Heart Failure in Dogs Presenting with Cough or Dyspnea. *J Vet Intern Med.* **21**:243–250.

Dingli D, Utz JP, Krowka MJ, Oberg AL, Teferi A (2001). Unexplained pulmonary hypertension in chronic myeloproliferative disorders. *Chest.* **120**:801-8.

Ettinger S e Kantrowitz B. (2006). Disease of the trachea. In: Ettinger S, Feldman EC, editors. Textbook of veterinary internal medicine. 6th edition. St. Louis (MO). Elsevier Saunders, p. 1217–32.

Evans TC e Jehle D (1991). The red blood cell distribution width. J Emerg Med. **9**:71-74 (S6).

Farber HW e Loscalzo J (2004). Pulmonary Arterial Hypertension. N Engl J Med. **351**:1655-65.

Felker GM, Allen LA, Pocock SJ, Shaw LK, McMurray JJ, Pfeffer MA, Swedberg K, Wang D, Yusuf S, Michelson EL, Granger CB (2007). Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure. J Am Coll Cardiol. **50**:40–47.

Fine DM, Declue AE e Reinero CR (2008). 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. J Am Vet Med Assoc. **232**:1674-79.

Fisher MR, Forfia PR, Chamera E, Houston-Harris T., Champion H.C., Girgis R.E., Corretti M.C., Hassoun P.M., (2009). Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. Am J Resp Crit Care Med. **179**, 615-21.

Förhécz Z, Gombos T, Borgulya G, Pozsonyi Z, Prohaszka Z, Janoskuti L (2009). Red cell distribution width in heart failure: prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state. Am Heart J. **158**, 659–666.

Galiè N, A Torbicki, R Barst , Darteville P, Haworth S, Higenbottam S, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, Simonneau G (2004): Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension; The Task Force on Diagnosis and Treatment of

Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 25:2243–78.

Georges E (2013). Red Blood Cell Distribution Width Is a Predictor of Readmission in Cardiac Patients. *Clin Card*. **36**(5): 293–99.

Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadas B, Scermuly RT, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F (2004). Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol*. **44**(7):1488-96.

Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP (2004). Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*. **350**:886-95.

Goetze JP, Christoffersen C, Perko M, Perko M, Arendrup H, Rehfeld JF, Kastrup J, Nielsen LB (2003). Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia. *FASEB J*. **17**:1105-07.

Grossman W (1996). Brachial cutdown approach. In Baim DS, Grossman W (ed) *Cardiac Catheterization, Angiography, and Intervention* (ed5) Baltimore, Williams & Wilkins. pp 83-95.

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

Guglielmini C, Civitella C, Diana A, Di Tommaso M, Cipone M, Luciani A (2010). Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Precapillary and Postcapillary Pulmonary Hypertension. *J Vet Intern Med*. **24**:145–52.

Guglielmini C, Poser H, Dalla Pria A, Drigo M, Mazzotta E, Berlanda M, Luciani A (2013). Red blood cell distribution width in dogs with chronic degenerative valvular disease. *J Am Vet Med Ass.* **243**:858-62.

Guray Y, Ipek EG, Guray U, Demirkan B, Kafes H, Asarcikli LD, Cabuk G, Yilmaz MB (2014). Red cell distribution width predicts mortality in infective endocarditis. *Arch Cardiovasc Dis.* **107**: 299–307.

Hackner, SG (2009). Pulmonary thromboembolism. In: Bonagura J.D. and Twedt D.C. (Eds.), *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 689-97.

Häggström J, Hansson K, Kvart C, Karlberg BE, Vuolteenaho O, Olsson K (1997). Effects of naturally acquired decompensated mitral valve regurgitation on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic peptide concentration in dogs. *Am J Vet Res.* **58**(1):77-82.

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

Hampole CV, Mehrotra AK, Thenappan T, Gomberg-Maitland M, Shah SJ (2009). Usefulness of red cell distribution width as a prognostic marker in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology.* **104**: 868–872.

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

Hezzell MJ, Boswood A, Moonarmart W, Elliott J, (2012). Selected echocardiographic variables change more rapidly in dogs that die from myxomatous mitral valve disease. *J Vet Cardiol.* **14**:269-79.

Hodges J e Christopher MM (2011). Diagnostic accuracy of using erythrocyte indices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **238**:1452-58.

Hori Y, Uchide T, Saitoh R., Thoei D, Uchida M, Yoshioka K, Chikazawa S, Hoshi F (2012). Diagnostic utility of NT-proBNP and ANP in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Vet J.* **194**:215-21.

Humbert M e McLaughlin VV (2009). The 4th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**: 1, Suppl S, S1-S2.

Ichinose F, Roberts JD, Zapol WM (2004). Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. *Circulation.* **109**(25):3106-11.

Johnson L (1999). Diagnosis of Pulmonary Hypertension. *Clin Tech Small An P.* **14**:231-36.

Johnson L, Boon J, Orton EC (1999). Clinical characteristics of 53 dogs with Doppler-derived evidence of pulmonary hypertension: 1992-1996. *J Vet Int Med.* **13**:440-47.

Jung C, Fujita B, Lauten A, Kiehntopf M, Kütke F, Ferrari M, Figulla HR (2011). Red blood cell distribution width as useful tool to predict long-term mortality in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol.* **152**:417-418.

Kellihan HB e Stepien RL.(2010). Pulmonary hypertension in dogs: diagnosis and therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* **40**(4):623-41.

Kellihan HB, MacKie BA, Stepien RL (2011). NT-proBNP, NT-proANP and cTnI concentrations in dogs with pre-capillary pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol.* **13**:171-82.

Kerbaul F, Brimioulle S, Rondelet B, Dewachter C, Hubloue I, Naeije R (2007). How prostacyclin improved cardiac output in right heart failure in conjunction with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* **175**:846-50.

Killingsworth C, Denney T, Zheng J, Powell P, Tillson M, Dillon AR, Dell'Italia LJ (2008). Dissociation between cardiomyocyte function and remodeling with beta-adrenergic receptor blockade in isolated canine mitral regurgitation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **295**(6):H2321-7.

Kim H, Yung GL, Marsh JJ, Konopka RG, Pedersen CA, Chiles PG, Morris TA, Channick RN (2000). Endothelin mediates pulmonary vascular remodeling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Eur Resp.* **15**:640-48.

Kitabatake A, Inoue M, Asao M, Masuyama T, Tonouchi J, Morita T, Ishima M, Uematsu M, Shimazu T, Hori M, Abel H (1983). Noninvasive evaluation of pulmonary hypertension by pulsed Doppler technique. *Circulation.* **68**(2):302-309.

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

Kittleson MD e Kienle RD (1998). Pulmonary arterial and systemic arterial hypertension. In: Kittleson MD, Kienle RD, eds. *Small Animal Cardiovascular Medicine*. Saint Louis, MO: Mosby pp.433–439.

Klinger JR, Hill NS (1991). Right ventricular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. Evaluation and management. *Chest* **99**:715.

Lankeit M, Dellas C, Panzenbock A, Skoro-Sajer N, Bonderman D, Olschewski M, Schafer K, Puls M, Konstantinides S, Lang IM (2008). Heart type fatty acid-binding protein for risk assessment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. **31**:1024-29.

Lee WS e Kim TK (2010). Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in rheumatoid arthritis. *Arch Pathol Lab Med*. **134**:505–06.

Lettieri CJ, Nathan SD, Barnett SD, Ahmad S, Shorr AF (2006). Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. **129**:746-52.

Magga J, Vuolteenaho O, Tokola H, Marttila M, Ruskoaho H (1998). B-type natriuretic peptide: a myocyte-specific marker for characterizing load-induced alterations in cardiac gene expression. *Ann Med*. **30**(1):39-45.

McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, Mathier MA, McGoon MD, Park MH, Rosenson RS, Rubin LJ, Tapson VF, Varga J (2009). ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol*. **53**(17):1573-1619.

Mercier E, Mathieu M, Sandersen CF, Delvaux FH, Clercx CM, Entee KM (2010). Evaluation of the influence of age on pulmonary arterial pressure by use of right ventricular catheterization, pulsed-wave Doppler echocardiography, and pulsed-wave tissue Doppler imaging in healthy Beagles. *Am J Vet Res* **71**(8):891-97.

Mishima T, Tanimura M, Suzuki G, Todor A, Sharov VG, Goldstein S, Sabbah HN (2000). Effects of long-term therapy with bosentan on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *J Am Coll Cardiol* **35**(1):222-29.

Montagnana M, Cervellin G, Meschi T, Lippi G (2012). The role of red blood cell distribution width in cardiovascular and thrombotic disorders. *Clin Chem Lab Med.* **50**:635-41.

Nanas JN, Matsouka C, Karageorgopoulos D et al (2006): Etiology of Anemia in Patients With Advanced Heart Failure. *J Am Coll Card.* **8**(12):2485-89.

Nathan SD, Reffett T, Brown AW, Fischer CP, Shlobin OA, Ahmad S, Weir N, Sheridan MJ (2013). The red cell distribution width as a prognostic indicator in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* **143**:1692-98.

Nickel N, Kempf T, Tapken H, Tongers J, Laenger F, Lehmann U, Golpon H, Olsson K, Wilkins MR, Gibbs JS, Hoeper MM, Wollert KC (2008). Growth differentiation factor-15 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* **178**: 534-41.

Nicolle AP, Chetboul, VO, Allerheiligen T, Pouchelon JL, Gouni V, Tessier-Vetzel D, Sampedrano CC, Lefebvre HP (2007). Azotemia and glomerular filtration rate in dogs with chronic valvular disease. *J of Vet Intern Med* **21**:943-49.

Nunes H, Humbert M, Sitbon O, Morse JH, Deng Z, Knowles JA, Le Gall C, Parent F, Garcia G, Herve P, Barst RJ, Simonneau G (2003). Prognostic factors for survival in human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* **167**: 1433-1439.

O'Hanlon R, O'Shea P, Ledwidge M, O'Loughlin C, Lange S, Conlon C, Phelan D, Cunningham S, McDonald K (2007). The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *J Card Fail.* **13**:50–5.

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

Oh J, Kang SM, Hong N, Choi JW, Lee SH, Park S, Shin MJ, Jang Y, Chung N (2009). Relation between red cell distribution width with echocardiographic parameters in patients with acute heart failure. *J Card Fail.* **15**:517–522.

Oswald-Mammosser M, Weitzenblum E, Quoix E, Moser G, Chaouat A, Charpentier C, Kessler R (1995). Prognostic factors in COPD patients receiving long-term oxygen therapy. Importance of pulmonary artery pressure. *Chest.* **107**: 1193-98.

Oyama MA e Singletary GE (2010). The Use of NT-proBNP Assay in the Management of Canine Patients with Heart Disease. *Vet Clin Small Anim.* **40**:545–58.

Oyama MA e Sisson DD (2004). Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J Vet Intern Med.* **18**(6):831-39.

Ozsu A., Abul Y., Gunaydin S., Orem A., Ozlu T (2014). Prognostic value of red cell distribution width in patients with pulmonary embolism. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* **20**:365-70.

Pascual-Figal DA, JC Bonaque, B Redondo Caro C, Manzano-Fernandez S, Sánchez-Mas J, Garrido IP, Valdes M(2009). Red blood cell distribution width predicts long-term outcome regardless of anaemia status in acute heart failure patients. *Eur J of Heart Fail.* **11**:840–46.

Piek CJ, Junius G, A Dekker A, Schrauwen E, Slappendel RJ, Teske E (2008). Idiopathic Immune-Mediated Hemolytic Anemia: Treatment Outcome and Prognostic Factors in 149 Dogs. *J Vet Intern Med.* **22**:366–73.

Podolsky DK (2002). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **347**(6):417–29.

Pyle RL, Abbott J, MacLean H (2004). Pulmonary hypertension and cardiovascular sequelae in 54 dogs. *T Int J Appl Res Vet Med*. **2**:99-109.

Rademaker MT, Charles CJ, Espiner EA, Frampton CM, Nicholls MG, Richards AM (2004). Combined inhibition of angiotensin II and endothelin suppresses the brain natriuretic peptide response to developing heart failure. *Clin Sci*. **106**:569-76.

Rhodes CJ, Wharton J, Howard LS, Gibbs JS, Wilkins MR (2011). Red cell distribution width outperforms other potential circulating biomarkers in predicting survival in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Heart*. **97**:1054 –60.

Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK (1987). Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med*. **107**:216-23.

Roberts KE, Hamele-Bena D, Saqi A, Stein CA, Cole RP (2003). Pulmonary tumor embolism: a revive of the literature. *Am J Med*. **155**:228-32.

Ronco C. (2010). Cardiorenal syndromes: definition and classification. *Contribution to nephrology*. **164**: 33-8.

Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G (2001). Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest*. **120**(5):1562-69.

Rubin LJ, Hoeper MM, Klepetko W, Galie N, Lang IM, Simonneau G (2006). Current and future management of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from diagnosis to treatment responses. *Proc Am Thorac Soc*. **3**:601-7.

Sánchez-Chaparro MA, Calvo-Bonacho E, González-Quintela A, Cabrera M, Sáinz JC, Fernández-Labandera C, Quevedo Aguado L, Fernández Meseguer A, Valdivielso P, Román-García J (2010). Ibermutuamur Cardiovascular Risk Assessment Study Group. Higher red blood cell distribution width is associated with the metabolic syndrome: results of the Ibermutuamur Cardiovascular Risk assessment study. *Diabetes Care* **33**: 3.

Schober KE, Baade H (2006). Doppler echocardiographic prediction of pulmonary hypertension in West Highland white terriers with chronic pulmonary disease. *J Vet Intern Med.* **20**(4):912-920.

Serres F, Pouchelon JL, Poujol L, Lefebvre HP, Trumel C, Daste T, Sampedrano CC, Gouni V, Tissier R, Hawa G, Chetboul V (2009). Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *J Vet Cardiol.* **11**:103-121.

Serres FJ, Chetboul V, Tissier R, Carlos Sampedrano C, Gouni V, Nicolle AP, Pouchelon JL (2006). Doppler echocardiography-derived evidence of pulmonary arterial hypertension in dogs with degenerative mitral valve disease: 86 cases (2001-2005). *J Vet Intern Med.* **229**:1772-78.

Sherif H, Ramadan N, Radwan M, Hamdy E e Reda R (2013). Red Cell Distribution Width as a Marker of Inflammation in Type 2 Diabetes Mellitus *Life Science Journal* **10**(3):1501-07.

Simonneau G, Galié N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrech D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A (2004). Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* **43**:S5-S12.

Simonneau G, Robbins I, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine S, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* **54**:S43-S54.

Sincer I, Zorlu A, Yilmaz MB, Dogan OT, Ege MR, Amioglu G, Aydin G, Ardic I, Tandogan I (2012). Relationship between red cell distribution width and right ventricular dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Heart Lung* . 41:238-43.

Sisson DD (2004). Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. *Vet Clin Small Anim*. **34**:1105-26.

Song CS, Park DI, Yoon MY, Seok HS, Park JH, Kim HJ (2012). Association between red cell distribution width and disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **57** :1033–38.

Stepien RL (2009). Pulmonary arterial hypertension secondary to chronic left-sided cardiac dysfunction in dogs. *J Small Anim Pract* . **50**:34-43 (S1).

Tancredi RG (1992). Pulmonary vascular disease: Primary pulmonary hypertension. *Cardiovasc Clin*. **22**:113-24.

Thomas WP, Gaber CE, Jacobs J, Kaplan PM, Lombard CW, Moise NS, Moses BL (1993). Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. *J of Vet Intern Med*. **7**:247-52.

Tilley LP (1992). *Essentials of canine and Feline Electrocardiography* (ed 3) Philadelphia, PA, Lea & Febiger.

Tonelli M, Sacks F, Arnold M, Moye L, Davis B, Pfeffer M (2008). Relation Between Red Blood Cell Distribution Width and Cardiovascular Event Rate in People With Coronary Disease. *Circulation*. **117**:163-68.

Tongers J, Schwerdtfeger B, Klein G, Kempf T, Schaefer A, Knapp JM, Niehaus M, Korte T, Hoepfer MM (2007). Incidence and clinical relevance of supraventricular tachyarrhythmias in pulmonary hypertension. *Am Heart J*. **153**:127-32.

Torbicki A, Kurzyna M, Kuca P, Fijałkowska A, Sikora J, Florczyk M, Pruszczyk P, Burakowski J, Wawrzynska L. (2003). Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Circulation* **108**: 844-8.

Tvedten H. (2010). Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: Weiss D.J., Wardrop K.J., eds. *Schalm's veterinary hematology*, 6th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, pp. 152–161.

Uchida T e Saida K.(2005). Elevated endothelin-1 expression in dogs with heartworm disease. *J Vet Med Sci.* **67**(11):1155-61.

Vayá A, Alisb R, Hernández JL, Calvo J, Micòd L, Romagnolie M e Ricart JM (2013). RDW in patients with systemic lupus erythematosus. Influence of anaemia and inflammatory markers. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **54**: 333–339.

Vila G, Resl M, Stelzeneder D, Struck J, Maier C, Riedl M, Hülsmann M, Pacher R, Luger A, Clodi M (2008). Plasma NT-proBNP increases in response to LPS administration in healthy men. *J Appl Physiol.* **105**:1741-45.

Wiese S, Breyer T, Dragu A, Wakili R, Burkard T, Schmidt-Schweda S, Fuchtbauer EM, Dohrmann U, Beyersdorf F, Radicke D, Holubarsch CJ (2000). Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circulation.* **102**:3074-79.

Williams MH, Handler CE, Akram R, Smith CJ, Das C, Smee J, Nair D, Denton CP, Black CM, Coghlan JG (2006). Role of N-terminal brain natriuretic peptide (N-TproBNP) in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J.* **27**: 1485-94.

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

Xi Q, Wang Y, Liu Z, Zhao Z, Luo Q (2014). Red cell distribution width to predicts chronic thromboembolic pulmonary hypertension in patients with acute pulmonary embolism in a long-term follow-up. *Clin Chem Lab Med.* **52**:191-95.

Ye Z, Smith C, Kullo IJ (2011). Usefulness of red cell distribution width to predict mortality in patients with peripheral artery disease. *J Am Coll Card.* **107**:1241–45.

Yesil A, Senates E, Bayoglu IV, Erdem ED, Demirtunc R, Kurdas Ovunc AO (2011). Red cell distribution width: A novel marker of activity in inflammatory bowel disease. *Gut Liver.* **5**:460–67.

Yigla M, Nakhoul F, Sabag A. (2003). Pulmonary hypertension in patients with end-stage renal disease. *Chest.* **123**: 1577-82.

Zalawadiya SK, Veeranna V, Niraj A, Pradhan J, Afonso L (2010). Red cell distribution width and risk of coronary heart disease events. *Am J Cardiol* **106**:988 – 93.

Zorlu A, Bektasoglu G, Kukul Guven FM, Dogan OT, Gucuk E, Ege MR, Altay H, Cinar Z, Tandogan I, Yilmaz MB (2012). Usefulness of admission red cell distribution width as a predictor of early mortality in patients with acute pulmonary embolism. *Am J Cardiol.* **109**:128-34.

Zwissler B, Welte M, Messmer K (1995). Effects of inhaled prostacyclin as compared with inhaled nitric oxide on right ventricular performance in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* **9**(3):283-89.