

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e  
Salute**

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

**Ruolo prognostico di Red blood cell  
Distribution Width (RDW) in cani con malattia  
degenerativa della valvola mitralica**

Relatore  
Prof. Carlo Guglielmini

Correlatore  
Dott.ssa Carlotta Valente

Laureanda  
Chiara Martina  
Valentini

Matricola n.  
1142830

ANNO ACCADEMICO 2020 - 2021



# INDICE

|  |    |
|--|----|
| ABSTRACT.....  | 7  |
| RIASSUNTO.....   | 9  |
| <br>   |    |
| 1. INTRODUZIONE.....   | 11 |
| <br>   |    |
| 2. MALATTIA DA DEGENERAZIONE MIXOMATOSA VALVOLARE<br>MITRALICA (MMVD)..... | 15 |
| 2.1. Epidemiologia.....  | 19 |
| 2.2. Eziologia.....  | 20 |
| 2.3. Fisiopatologia.....   | 21 |
| 2.4. Diagnosi.....   | 24 |
| 2.5. Classificazione ACVIM.....  | 38 |
| 2.6. Prognosi.....   | 42 |
| 2.7. Trattamento.....  | 43 |
| 2.8. Complicazioni in corso di MMVD.....                                   | 49 |
| 2.8.1. Fibrillazione atriale.....  | 49 |
| 2.8.2. Ipertensione polmonare.....   | 52 |
| 2.8.3. Rottura dell'atrio sinistro.....                                    | 56 |
| <br>   |    |
| 3. RDW COME <i>BIOMARKER</i> DI MALATTIA.....                              | 59 |
| 3.1. RDW in medicina umana.....  | 61 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 3.2.   | RDW in medicina veterinaria.....                                | 67  |
| 4.     | CONTRIBUTO SPERIMENTALE.....                                    | 75  |
| 4.1.   | Obiettivi dello studio.....                                     | 76  |
| 4.2.   | Materiali e metodi.....   | 77  |
| 4.2.1. | Animali.....  | 77  |
| 4.2.2. | Esame ecocardiografico.....                                     | 78  |
| 4.2.3. | Esami di laboratorio.....                                       | 80  |
| 4.2.4. | Indagine del <i>follow up</i> .....                             | 82  |
| 4.2.5. | Analisi statistica.....   | 83  |
| 4.3.   | Risultati.....  | 85  |
| 4.3.1. | Animali.....  | 85  |
| 4.3.2. | Variabili ecocardiografiche e laboratoristiche.....             | 88  |
| 4.3.3. | Coefficiente di correlazione e analisi della sopravvivenza..... | 90  |
| 4.4.   | Discussione.....  | 95  |
| 5.     | CONCLUSIONI.....  | 103 |
|        | APPENDICE.....  | 105 |
|        | BIBLIOGRAFIA.....   | 107 |

# INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

|   |  |
|---|--|
| ACE: <i>angiotensin converting enzyme</i>                       | IVSs/d: <i>interventricular septum systolic/diastolic</i>            |
| ACVIM: <i>American College of Veterinary Internal Medicine</i>  | LA/Ao: <i>left atrium to aorta</i>                                   |
| Alb: <i>albumina</i>  | LV: <i>left ventriculum</i>  |
| ANP: <i>atrial natriuretic peptide</i>                          | LVFW: <i>left ventricular free wall</i>                              |
| ARJ/LAA: <i>regurgitant jet area signal to left atrium area</i> | LVDD: <i>left ventricular diastolic volume</i>                       |
| BNP: <i>brain natriuretic peptide</i>                           | LVDDn: <i>normalized left ventricular diastolic volume</i>           |
| BUN: <i>blood urea nitrogen</i>                                 | LVDS: <i>left ventricular systolic volume</i>                        |
| BW: <i>body weight</i>  | LVDSn: <i>normalized left ventricular systolic volume</i>            |
| CHF: <i>congestive heart failure</i>                            | LVPWs/d: <i>left ventricular posterior wall end systole/diastole</i> |
| CI: <i>confidence interval</i>                                  | MCV: <i>mean cellular volume</i>                                     |
| CKCS: <i>Cavalier King Charles Spaniel</i>                      | MMVD: <i>myxomatous mitral valve disease</i>                         |
| cTnI: <i>cardiac troponin-I</i>                                 | MR: <i>mitral regurgitation</i>                                      |
| CVD: <i>cardiovascular disease</i>                              | NT-proBNP: <i>N-terminal pro hormone BNP</i>                         |
| EDV: <i>end diastolic volume</i>                                | OVUD: <i>Ospedale Veterinario Universitario Didattico</i>            |
| EF: <i>ejection fraction</i>                                    | PAP: <i>pulmonary arterial pressure</i>                              |
| ESV: <i>end systolic volume</i>                                 | PG: <i>pressure gradient</i>   |
| EV: <i>endovena</i>   | PH: <i>pulmonary hypertension</i>                                    |
| FA: <i>fibrillazione atriale</i>                                | PISA: <i>Proximal Isovelocity Surface Area</i>                       |
| FS: <i>fractional shortening</i>                                | PLT: <i>platelet</i>   |
| GAG: <i>glycosaminoglycan</i>                                   | PO: <i>per os</i>  |
| GR: <i>globuli rossi</i>  |  |
| Hb: <i>emoglobina</i>   |  |
| Hct: <i>ematocrito</i>  |  |
| HCM: <i>hypertrophic cardiomyopathy</i>                         |  |
| HR: <i>heart rate</i>   |  |

PT: protein totali

RAAS: *Renin-Angiotensin-Aldosterone System*

RBC: *red blood cells*

RDW: *red blood cell distribution width*

RF: *regurgitant fraction*

RR: *respiratory rate*

RRR: *resting respiratory rate*

RT: *rectal temperature*

RVIDd: *right ventricular diastolic internal diameter*

RVOT: *right ventricular outflow tract*

SD: *standard deviation*

TR: *tricuspid regurgitation*

TRV: *tricuspid regurgitation velocity*

UO: *unità operativa*

VBU: *vertebral body unit*

VHS: *vertebral heart score*

VIC: *valvular interstitial cells*

VLAS: *vertebral left atrial size*

WBC: *white blood cells*

## ABSTRACT

Red blood cell distribution width (RDW) is a simple and inexpensive laboratory parameter used to measure the degree of anisocytosis. This hematological parameter is an important prognostic biomarker for different cardiovascular and systemic disorders in humans. On the contrary, its influence on survival has been poorly investigated in dogs with cardiovascular disease.

Myxomatous mitral valve disease (MMVD) is the most common cardiovascular disease in dogs. The staging system proposed by the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) for MMVD describes four basic stages of heart disease and heart failure. Several imaging techniques (e.g., thoracic X-ray and echocardiography) are required to diagnose and stage MMVD.

The RDW and various clinical, complete blood count, serum biochemical and echocardiographic variables were retrospectively investigated in 146 client-owned dogs with MMVD at various stages. Laboratory variables, including RDW, urea, and WBC, in addition to the echocardiographic variable left atrium to aorta ratio (LA/Ao) were found to be independent predictors of all-cause mortality at six months in a multivariable Cox proportional hazards regression model. The negative effect of increased RDW on outcome was confirmed using Kaplan Meyer curve analysis.

The results of this study indicate that RDW acted as an independent predictor of negative outcome in dogs with MMVD.



## RIASSUNTO

*Red blood cell distribution width* (RDW) è un parametro laboratoristico facilmente misurabile ed economico utilizzato per quantificare il grado di anisocitosi. Questo parametro ematologico presenta un importante significato prognostico per diversi disturbi cardiovascolari e sistemici nell'uomo. Al contrario, la sua influenza sulla sopravvivenza è stata scarsamente studiata nei cani con malattie cardiovascolari.

La malattia da degenerazione mixomatosa della valvola mitrale (MMVD) è la malattia cardiovascolare di più comune riscontro nel cane. Il sistema di stadiazione di MMVD proposto dall' *American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM) definisce quattro stadi della malattia caratterizzati da diversi segni clinici e reperti di *imaging*. Tra le tecniche di diagnostica per immagini, la radiografia e l'ecocardiografia sono necessarie per la diagnosi e la stadiazione di MMVD.

RDW e alcune variabili cliniche, laboratoristiche ed ecocardiografiche sono state investigate retrospettivamente in 146 cani di proprietà affetti da MMVD in diversi stadi di gravità. L'analisi statistica secondo il modello di regressione multivariata di Cox ha evidenziato che i parametri laboratoristici RDW, concentrazione ematica di urea e concentrazione ematica di leucociti, insieme alla variabile ecocardiografica del rapporto atrio sinistro/aorta (LA/Ao) costituiscono dei fattori indipendenti predittivi di mortalità per qualsiasi causa a sei mesi. L'effetto negativo dell'aumento di RDW sull'*outcome* è stato confermato utilizzando l'analisi della curva di Kaplan Meyer.

I risultati di questo studio indicano dunque che RDW rappresenta un indicatore predittivo indipendente di esito negativo nei cani con MMVD.



# 1. INTRODUZIONE

Il cane può essere colpito da numerose malattie cardiache congenite e acquisite. Il corredo sintomatologico che accompagna queste patologie è molto ampio e per arrivare ad una diagnosi definitiva l'iter diagnostico spesso è lungo ed economicamente impegnativo per il proprietario.

La patologia cardiaca acquisita più frequente nel cane è la malattia da degenerazione mixomatosa della valvola mitralica o malattia degenerativa valvolare mitralica (*myxomatous mitral valve disease*, MMVD). Colpisce soprattutto i cani anziani, infatti in questa porzione della popolazione canina la prevalenza della patologia si avvicina al 100%. MMVD è la causa più frequente di insufficienza cardiaca in questa specie e, nelle forme più avanzate, può portare allo sviluppo di insufficienza cardiaca congestizia e alla morte dell'animale (Borgarelli e Buchanan, 2012).

La patologia si può associare a numerosi sintomi, tra cui tosse, tachipnea, intolleranza all'esercizio ed eventuale sincope. Solitamente, il segnalamento e la raccolta dell'anamnesi seguite da un accurato esame obiettivo generale consentono di formulare un sospetto diagnostico per MMVD, tuttavia la conferma della diagnosi e la successiva stadiazione richiedono l'uso di tecniche di *imaging* come la radiografia toracica e l'ecocardiografia. Oltre alla diagnostica per immagini, recentemente, anche l'utilizzo di *biomarker* laboratoristici sta acquisendo un significato diagnostico e, soprattutto, prognostico.

Ad oggi, i parametri laboratoristici più utilizzati per indagare la presenza e la gravità di eventuali malattie cardiache sono il frammento amminoterminale del pro peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) e la troponina I cardiaca (cTnI); la misurazione di questi valori richiede però metodiche laboratoristiche avanzate difficilmente eseguibili nella maggior parte delle strutture veterinarie. La necessità del consulto di un laboratorio esterno allunga i tempi e aumenta il costo dell'iter diagnostico (Tarnow et al., 2009; Ljungvall et al., 2010; Hezzell et al., 2012; Chan et al., 2019; Ogawa et al., 2021).

Il riscontro di ulteriori parametri laboratoristici facilmente misurabili ed economici potrebbe essere di grande aiuto per classificare meglio lo stato del paziente e per ottenere informazioni prognostiche affidabili.

Negli ultimi anni, diversi studi in medicina umana si sono diretti verso la ricerca di un parametro semplice da ottenere, economico e in grado di fornire informazioni utili per la diagnosi e la prognosi di diverse patologie. Un parametro laboratoristico che ha fornito risultati promettenti è *Red blood cell distribution width* (RDW) ovvero l'indice che misura il grado di eterogeneità del volume dei globuli rossi circolanti. RDW è facilmente misurabile a partire dai risultati di un esame emocromocitometrico eseguibile con un analizzatore ematico. Tradizionalmente, sia in medicina umana che in medicina veterinaria, questo parametro è stato utilizzato per differenziare le anemie rigenerative da quelle non rigenerative.

Gli studi più recenti in medicina umana hanno riscontrato in più occasioni che l'aumento di RDW è positivamente correlato con la gravità di diverse malattie cardiovascolari e non. Inoltre, tale parametro laboratoristico costituisce un *marker* prognostico negativo in corso di svariate patologie. I meccanismi fisiopatologici non sono tuttora del tutto chiari, ma sono state formulate più ipotesi che coinvolgono soprattutto uno stato di infiammazione generalizzata e un'alterata funzionalità dell'eritropoietina (Salvagno et al., 2015; Danese et al., 2015; Arbel et al., 2014; Allen et al., 2010; Forhéc et al., 2009; Al Najjar et al., 2009; Felker et al., 2007).

Il riscontro di un significato simile di RDW anche in medicina veterinaria sarebbe estremamente utile: la possibilità di ottenere informazioni prognostiche da un parametro di immediata lettura e ricavabile di routine potrebbe essere di grande aiuto nella scelta del trattamento. I vantaggi riguarderebbero soprattutto i pazienti con prognosi incerta con proprietari che non hanno la possibilità di investire in indagini diagnostiche più avanzate.

Ad oggi, nel cane, RDW è stato valutato in animali con diverse patologie sistemiche e disordini cardiovascolari inclusa MMVD. I risultati ottenuti fino ad adesso sono contrastanti e strettamente dipendenti dai limiti del tipo di studio eseguito (Guglielmini et al., 2013, Martinez et al., 2019).

Per ora, le indagini che hanno riguardato MMVD suggeriscono che non ci sia una correlazione tra RDW e la gravità della patologia, ma al momento nessuno studio ha indagato il valore prognostico di RDW in cani con malattia degenerativa mitralica.

Il presente elaborato riassume le caratteristiche principali di MMVD e di RDW come biomarker di malattia proponendo un excursus della letteratura scientifica prodotta circa questi argomenti.

In seguito, verranno presentati *study design*, materiali e metodi e risultati di uno studio retrospettivo effettuato presso l'Università degli Studi di Padova per investigare il valore prognostico di RDW in cani con MMVD.



## 2. MALATTIA DA DEGENERAZIONE MIXOMATOSA DELLA VALVOLA MITRALE (MMVD)

La malattia da degenerazione mixomatosa della valvola mitrale rappresenta la patologia cardiaca acquisita più comune nel cane.

È caratterizzata da una degenerazione progressiva di tipo mixomatoso dei lembi valvolari; il processo degenerativo è rappresentato dalla distruzione del collagene e dalla deposizione di mucopolisaccaridi acidi negli strati spongioso e fibroso. La patologia coinvolge più frequentemente la valvola atrioventricolare sinistra o valvola mitralica, tuttavia, almeno nel 30% dei casi, è coinvolta anche la valvola atrioventricolare destra o valvola tricuspide (Borgarelli e Buchanan, 2012).

L'apparato mitralico si colloca tra atrio sinistro e ventricolo sinistro, include i due lembi valvolari (anteriore o settale e posteriore o parietale), le commissure valvolari, l'annulus mitralico, le corde tendinee e i muscoli papillari.

Fisiologicamente, la valvola ha un aspetto traslucido e viene macroscopicamente divisa in tre regioni: prossimale, media e distale (chiamata anche margine libero).

Microscopicamente, ogni lembo valvolare ha una superficie atriale e una superficie ventricolare ricoperte da un singolo strato di cellule endoteliali, continuo con quello che riveste l'atrio e il ventricolo. Da un punto di vista istologico, la valvola mitralica presenta un aspetto stratificato: in direzione atrio – ventricolare si trovano gli strati atriale, spongioso, fibroso e ventricolare, ciascuno contenente quantità variabili di collagene I, III, IV e VI, laminina, fibronectina ed eparan solfato (Markby et al., 2017).

Lo strato atriale è sottile e ricco di elastina con una dose variabile di fibre collagene frammiste a cellule interstiziali valvolari (*valvular interstitial cells*, VIC).

La spongiosa è costituita da fibre di collagene lasse, fasci di collagene sparsi e un ridotto numero di fibre di elastina sottili incorporate in una sostanza di base ricca di glicosamminoglicani (*glycosaminoglycan*, GAG).

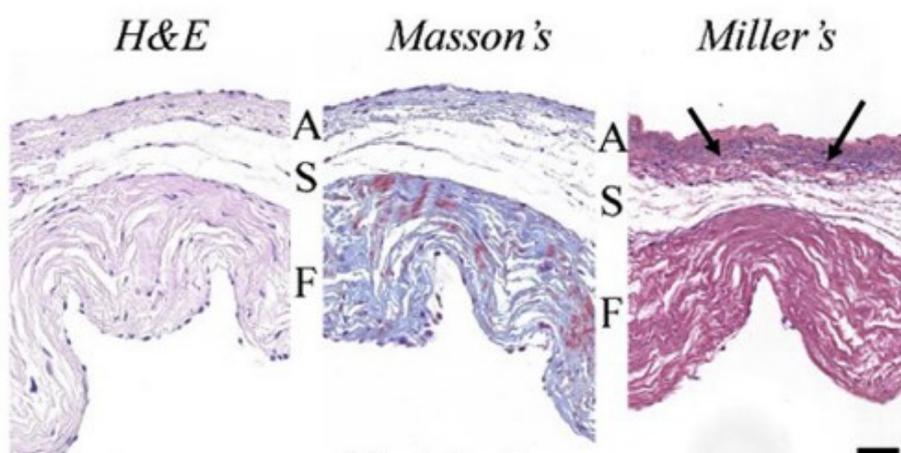
Immediatamente sotto la spongiosa, si trova lo strato di fibrosa denso e ben organizzato con fasci di collagene ben definiti e VIC disseminate. La fibrosa rappresenta la continuazione dell'annulus fibrosus e si estende poi all'interno del nucleo delle corde tendinee.

Il sottile strato subendoteliale sul lato ventricolare contiene fibre di collagene e occasionalmente elastina.

Verso la zona distale (margine libero) la distinzione tra spongiosa e fibrosa, almeno in alcuni cani, può diventare meno netta e la valvola a questo livello appare quasi interamente costituita da spongiosa ricoperta da endotelio (Han et al., 2013).

Il muscolo cardiaco si estende per una lunghezza variabile dal miocardio atriale lungo i lembi valvolari e, probabilmente, ha importanti implicazioni funzionali nella meccanica valvolare (Culshaw et al., 2010; Fox, 2012).

#### SUPERFICIE ATRIALE



#### SUPERFICIE VENTRICOLARE

**Figura 1.** Valvola mitralica canina normale. Distinzione istologica con tre diverse colorazioni istochimiche della stratificazione valvolare: A strato atriale, S spongiosa, F fibrosa. (adattato da Markby et al., 2017).

La chiusura e l'apertura della valvola mitralica sono attribuite alle differenze di pressione atrioventricolare durante il ciclo cardiaco. La valvola si apre nel momento in cui la pressione atriale supera quella ventricolare all'inizio della diastole e si chiude all'inizio della sistole quando la pressione ventricolare sinistra aumenta. Oltre al gradiente pressorio, diversi altri meccanismi integrati sono fondamentali perché ad ogni ciclo cardiaco la valvola mitrale sigilli l'ostio atrioventricolare evitando il rigurgito di sangue

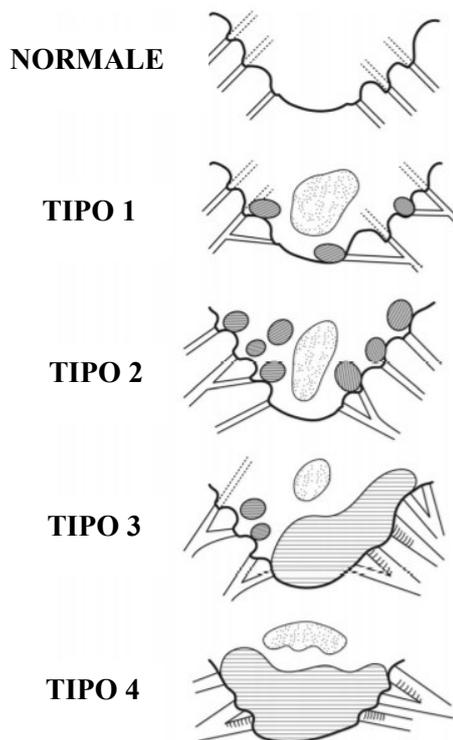
dal ventricolo all'atrio (conformazione e movimento dell'annulus, contrazione dei muscoli papillari e tensione delle corde tendinee) (Borgarelli e Crosara, 2018).

Le lesioni che evolvono in corso di MMVD possono essere suddivise in quattro categorie in base alla loro gravità e alla loro estensione: le lesioni di tipo I e II sono caratterizzate dalla presenza di piccoli ispessimenti nodulari dei lembi valvolari più o meno estesi, senza interessamento delle corde tendinee, il tipo III comprende le lesioni più estese sui lembi valvolari associate a valvole ridondanti, infine, nel tipo IV le lesioni si estendono anche alle corde tendinee e sono frequentemente associate alla rottura delle stesse (Pomerancel e Whitney, 1970).

Il prolasso della valvola mitrale è una complicanza comune della degenerazione mixomatosa della valvola e rappresenta una caratteristica prominente di MMVD in alcune razze canine.

Dal punto di vista istopatologico, i cambiamenti più evidenti in corso di MMVD sono l'espansione della spongiosa e la perdita o la distruzione della fibrosa. La modificazione mixomatosa comporta l'espansione del tessuto connettivo lasso della spongiosa e un aumento del materiale mucoide amorfo di colorazione metacromatica. Nelle aree mixomatose c'è una riduzione misurabile della densità del tessuto connettivo e un aumento del contenuto di GAG. Le alterazioni del tessuto si collocano tipicamente vicino al bordo della valvola (Markby et al., 2017).

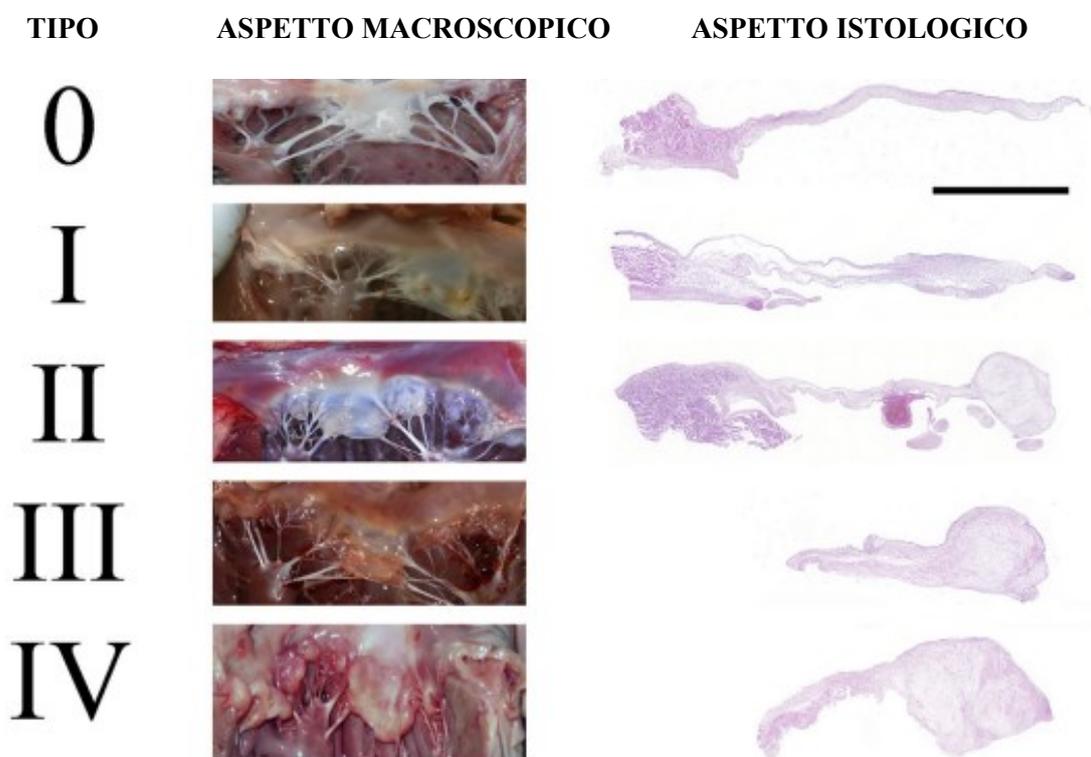
In un piccolo numero di cani con MMVD è stata segnalata anche la deposizione di amiloide (Schneider et al., 1971).



*Figura 2. Classificazione delle lesioni della valvola mitrale in corso di MMVD. Le aree tratteggiate rappresentano le aree di ispessimento diffuso o nodulare; le aree punteggiate rappresentano le aree opacizzate a causa della degenerazione mixomatosa (adattato da Pomerancel e Whitney, 1970).*

I residui dello strato fibroso possono essere apprezzati anche nelle fasi più avanzate della malattia, ma questo strato appare marcatamente disorganizzato (Han et al., 2013).

Anche le corde tendinee possono essere colpite da alterazioni simili a quelle riscontrabili sulle valvole. Le lesioni includono una significativa riduzione del collagene insieme ad un aumento del contenuto e ad un'alterazione della composizione di GAG. È probabile che tutti i cambiamenti descritti contribuiscano all'instabilità meccanica dell'intero complesso della valvola mitrale e abbiano conseguenze drammatiche in caso di rottura delle corde.



*Figura 3. Aspetto macroscopico e istologico della valvola mitrale in base al grado di lesione secondo la classificazione di Pomerancel e Withney (adattato da Markby et al., 2017).*

La progressiva deformazione della struttura valvolare, dovuta all'alterazione dei rapporti tra le sue componenti, impedisce un'efficace coaptazione dei lembi mitralici e causa rigurgito di sangue dal ventricolo sinistro nell'atrio sinistro in fase di sistole (insufficienza della valvola). Il rigurgito valvolare si aggrava progressivamente con l'evoluzione della patologia e aumenta il lavoro cardiaco, portando a rimodellamento

ventricolare (ipertrofia eccentrica e alterazioni della matrice intercellulare) e a disfunzione ventricolare (Atkins et al., 2009).

## 2.1. EPIDEMIOLOGIA

La MMVD rappresenta la patologia cardiaca più comune nel cane e la causa più frequente di scompenso cardiaco in questa specie. La malattia può colpire soggetti di tutte le razze, ma è diagnosticata soprattutto in soggetti di piccola taglia, in particolare nel Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) e nel Bassotto.

La malattia è positivamente correlata con l'età e la prevalenza, specialmente nei cani anziani e di piccola taglia, si avvicina al 100%. Anche l'incidenza di MMVD nella vita del cane (tasso di insorgenza in un periodo di tempo) nella maggior parte delle razze è vicina al 100% (Borgarelli e Buchanan, 2012).

La patologia è approssimativamente 1,5 volte più comune nei maschi rispetto alle femmine. La prevalenza è molto più elevata nei cani di piccola taglia (<20 kg), sebbene, a volte, anche alcune razze di grossa taglia possano esserne affette. Tra le razze di grossa taglia, la più colpita è il Pastore Tedesco. I cani di razza grande spesso sperimentano una progressione più rapida della patologia con una disfunzione miocardica più evidente e hanno una prognosi più riservata (Borgarelli et al., 2004). Nei cani di taglia piccola, la patologia generalmente procede più lentamente, ma talvolta progredisce in modo imprevedibile.

I Cavalier King Charles Spaniel sono particolarmente predisposti allo sviluppo di MMVD in un'età relativamente giovane, sebbene il decorso temporale della progressione della malattia verso l'insufficienza cardiaca non sembri essere nettamente diverso da quello di altri cani di piccola taglia (Keene et al., 2019).

L'insufficienza della valvola mitrale derivante dalla patologia si manifesta clinicamente con un soffio olosistolico apicale sinistro. Questo è un indicatore significativo della malattia, tuttavia alcuni cani con malattia lieve potrebbero non avere un soffio evidente, anche se hanno evidenza ecocardiografica di endocardiosi (degenerazione mixomatosa del tessuto valvolare) e di rigurgito mitralico (*mitral regurgitation, MR*). In particolare, i cani di taglia grande presentano più comunemente

criteri diagnostici ecocardiografici indicativi di MMVD, come ispessimento della valvola mitrale e presenza di MR, senza che ci sia un soffio rilevabile all'esame obiettivo generale (Borgarelli e Buchanan, 2012).

## **2.2. EZIOLOGIA**

L'esatta eziologia di MMVD non è stata ancora stabilita. Data l'elevata prevalenza della patologia in alcune razze, è stato ipotizzato che ci sia una componente ereditaria di tipo poligenico (Swenson et al., 1996; Olsen et al., 1999). La natura ereditaria della malattia non esclude comunque che altri fattori come l'anatomia dell'apparato mitralico, il grado di obesità e l'entità dell'esercizio fisico possano contribuire alla sua manifestazione clinica.

La malattia è caratterizzata da progressive alterazioni nei costituenti cellulari e nella matrice intercellulare dell'apparato valvolare. La modificazione del regolare e fisiologico rinnovo della matrice extracellulare sembra essere centrale in questi cambiamenti (Keene et al., 2019). Poiché la natura genetica da sola non può spiegare questo fenomeno, è stato ipotizzato che ci sia un evento iniziale che innesca il processo degenerativo a carico della valvola. Secondo la teoria più accreditata, la degenerazione mixomatosa è l'effetto di un continuo processo di danno e riparazione conseguente allo stress a cui la valvola è continuamente sottoposta. (Borgarelli et al., 2012).

Le VIC sono deputate alla sintesi della matrice extracellulare e alla riparazione e al rimodellamento delle valvole. Le VIC, normalmente quiescenti, vengono attivate in seguito al danno endoteliale e allo stress valvolare e iniziano dunque a sintetizzare diverse sostanze, tra cui collagene, fibronectina, elastina e fattori di crescita e a promuovere il rimodellamento della matrice extracellulare attraverso il rilascio di metalloproteinasi e inibitori delle metalloproteinasi. Il risultato finale di questo processo è la diminuzione del collagene e la deposizione di proteoglicani.

Nel complesso, il meccanismo di innesco della MMVD più accreditato prevede che l'azione di stress meccanico sulla valvola di un soggetto geneticamente predisposto determini l'attivazione delle VIC con successiva produzione di molecole ad azione rimodellante (Borgarelli e Crosara, 2018).

Oltre a questo meccanismo, è stato ipotizzato anche che anomalie recettoriali (sottotipi di recettori della serotonina, dell'endotelina o dell'angiotensina) sulle membrane dei fibroblasti nelle valvole dei cani affetti svolgano un ruolo nella fisiopatologia delle lesioni valvolari acquisite (Mow e Pedersen, 1999; Cremer et al., 2015; Oyama e Levy, 2010).

Anche i mediatori sistemici o locali metabolici, neurormonali o infiammatori (catecolamine endogene e citochine infiammatorie) possono influenzare la progressione della lesione valvolare o il successivo rimodellamento miocardico che accompagnano il rigurgito valvolare di lunga durata (Atkins et al., 2009).

### **2.3. FISIOPATOLOGIA**

La degenerazione mixomatosa a carico dei lembi valvolari mitralici esita spesso nel loro prolasso. La progressione delle lesioni valvolari a stadi più gravi comporta l'insorgenza di insufficienza mitralica con mancata chiusura completa dell'ostio atrioventricolare e conseguente rigurgito di sangue in atrio.

In genere, un'insufficienza valvolare lieve è ben tollerata e non determina nessuna risposta compensatoria. Tuttavia, con la progressione della malattia si verifica un graduale aumento della quota di rigurgito nell'atrio sinistro con conseguente riduzione della gittata cardiaca. Questo fenomeno, a sua volta, provoca l'attivazione di meccanismi di compenso come l'attivazione neuroendocrina e la risposta ipertrofica del muscolo cardiaco.

L'attivazione neuroendocrina include l'attivazione del sistema nervoso simpatico, del sistema renina – angiotensina – aldosterone (*renin–angiotensin–aldosterone system*, RAAS), delle endoteline e il rilascio di vasopressina e di peptidi natriuretici (Borgarelli e Crosara, 2018).

Le catecolamine aumentano la frequenza cardiaca e, grazie all'azione inotropica positiva, consentono di ristabilire in modo rapido la gittata cardiaca. L'attivazione cronica del sistema nervoso simpatico però determina un aumento del consumo di ossigeno, un effetto di vasocostrizione periferica e un aumento del lavoro cardiaco.

L'attivazione acuta del RAAS consente di ripristinare la portata cardiaca e la pressione di perfusione renale fisiologiche; allo stesso tempo l'attivazione cronica di questa risposta contribuisce alla progressione della malattia poiché determina un aumento del precarico e del postcarico ventricolare e favorisce il rimodellamento cardiaco.

La dilatazione atriale conseguente all'aumento della quota di MR tipica della progressione di MMVD determina il rilascio del fattore natriuretico atriale (*atrial natriuretic peptide*, ANP); l'ipertrofia eccentrica ventricolare sinistra associata al progressivo sovraccarico di volume determina il rilascio del fattore natriuretico cerebrale (*brain natriuretic peptide*, BNP). I peptidi natriuretici promuovono la diuresi attraverso l'aumento dell'escrezione del sodio in modo da bilanciare l'aumentata attività del sistema simpatico e del RAAS. Nelle fasi più avanzate dello scompenso cardiaco, tuttavia, l'azione dei peptidi natriuretici non è in grado di contrastare efficacemente l'attivazione degli altri meccanismi neuroormonali che tendono quindi a prevalere (Borgarelli e Crosara, 2018).

A causa delle particolari condizioni emodinamiche che si instaurano in corso di insufficienza mitralica conseguente a MMVD, ad un aumentato precarico corrisponde un diminuito postcarico ventricolare.

La diminuzione del postcarico è dovuta al fatto che una parte rilevante dell'eccessivo volume ventricolare viene espulsa nelle prime fasi della sistole nell'atrio sinistro che è una camera a bassa pressione (la fase isovolumetrica della sistole viene a mancare).

L'aumento del precarico ventricolare sinistro invece è dovuto all'incompleta eiezione del sangue in aorta e determina un'ipertrofia ventricolare di tipo eccentrico. Tale ipertrofia, in accordo con la legge di Frank Starling è associata ad un aumento della forza di contrazione (Chetboul e Tissier, 2012).

La diminuzione del postcarico e l'ipertrofia eccentrica, insieme alla stimolazione catecolaminica sono responsabili dei quadri di ipercinesia ventricolare sinistra. Infatti, se da un lato il diminuito postcarico ventricolare sinistro consente al ventricolo di sopportare sovraccarichi di volume importanti senza aumentare in modo significativo il lavoro cardiaco, dall'altro rappresenta uno stimolo insufficiente per lo sviluppo dell'ipertrofia parietale compensatoria necessaria per mantenere una normale tensione diastolica parietale.

L'insufficienza mitralica determina anche una dilatazione progressiva dell'atrio sinistro, l'aumento di volume della camera cardiaca consente di mantenere le pressioni di riempimento nei limiti della norma anche in presenza di significativi rigurgiti mitralici (Chetboul e Tissier, 2012).

La *compliance* atriale sinistra e la rapidità di insorgenza del rigurgito mitralico rappresentano i fattori più importanti per quanto riguarda lo sviluppo di edema polmonare. Se il rigurgito mitralico progredisce cronicamente, l'atrio sinistro è in grado di aumentare progressivamente le sue dimensioni mantenendo pressioni normali per lungo tempo. Se invece il rigurgito peggiora rapidamente, come avviene nel caso della rottura delle corde tendinee, il rapido aumento del volume è associato a un rapido aumento della pressione atriale e al conseguente edema polmonare (insufficienza cardiaca sinistra). Lo sviluppo di edema polmonare in pazienti con ingrandimento atriale cronico è in genere associato a una diminuita *compliance* atriale determinata dal rimodellamento subito dalla camera negli stadi più precoci della patologia (Borgarelli e Crosara, 2018).

La malattia cronica della valvola mitrale, dunque, presenta un lungo periodo preclinico caratterizzato inizialmente da cambiamenti morfologici osservabili solo all'autopsia (primo terzo di vita). In fase intermedia spesso la patologia progredisce con insufficienza della valvola mitrale e con conseguente dilatazione secondaria delle camere cardiache. Solo in fase tardiva (ultimo terzo della vita dell'animale) evolvono i segni tipici dell'ipertrofia cardiaca (Borgarelli et al, 2012).

MMVD è una malattia degenerativa con decorso progressivo che spesso esita in quadri di insufficienza cardiaca congestizia che possono portare alla morte dell'animale, tuttavia, occasionalmente, si verificano episodi di CHF acuta con morte improvvisa legati ad eventi quali aritmie o rottura dell'atrio sinistro. Di solito, l'insufficienza cardiaca si verifica anni dopo l'insorgenza dell'insufficienza mitralica in seguito alla comparsa di progressivo rimodellamento cardiaco e malattia miocardica (Borgarelli e Buchanan, 2012).

L'insufficienza cardiaca sinistra acuta con comparsa improvvisa di segni clinici in cani precedentemente asintomatici o paucisintomatici può verificarsi quando si rompe una corda tendinea maggiore o per rottura dell'atrio sinistro con successivo emopericardio.

## 2.4. DIAGNOSI

Il sospetto di MMVD è in genere dovuto al rilevamento, mediante l'auscultazione, di un soffio sistolico a plateau a livello apicale sinistro. La patologia degenerativa valvolare si sviluppa in particolar modo in cani anziani, di razza predisposta che presentano sintomi quali intolleranza all'esercizio, tosse, episodi sincopali o dispnea.

L'intensità del soffio è correlata alla gravità dell'insufficienza valvolare, ma non alla gravità della sintomatologia clinica o allo stadio della malattia cardiaca. Nei casi più gravi, il soffio è irradiato verso la base e a destra in conseguenza dell'ingrandimento atrioventricolare sinistro o della possibile concomitante presenza di insufficienza tricuspide (Borgarelli e Haggstrom, 2010).

Le modificazioni di alcuni parametri analizzati durante la visita clinica di un animale che presenta già segni di rimodellamento cardiaco e appartiene allo stadio B2 (ACVIM 2019) possono essere indicative di uno scompenso imminente. Parametri quali frequenza cardiaca (*heart rate*, HR), frequenza respiratoria in struttura (*respiratory rate*, RR), frequenza respiratoria a casa a riposo (*resting respiratory rate*, RRR), temperatura rettale (*rectal temperature*, RT) e peso corporeo (*body weight*, BW) presentano una variazione statisticamente significativa quando l'animale va incontro a insufficienza cardiaca congestizia (*congestive heart failure*, CHF). HR, RR e RRR aumentano, mentre BW e RT diminuiscono. Essendo i parametri con un cambiamento maggiore in valore assoluto e con il tempo di variazione minore RR e RRR, questo riscontro avvalorava l'utilizzo della RR per stimare la possibilità dell'insorgenza di insufficienza cardiaca (Boswood et al., 2020).

Dopo la visita clinica, l'iter diagnostico standard include l'esame radiografico del torace e l'esame ecocardiografico. Eventuali disturbi del ritmo evidenziati all'auscultazione o al monitoraggio elettrocardiografico simultaneo all'ecocardiografia possono essere indagati ulteriormente con elettrocardiografia.

La radiografia toracica dovrebbe essere sempre eseguita come parte della valutazione diagnostica di tutti i cani per i quali c'è il sospetto di MMVD indipendentemente dal fatto che abbiano segni clinici. Essa consente infatti di acquisire facilmente informazioni circa la dimensione del cuore, dei vasi polmonari e dei polmoni

e di confrontare i dati ottenuti con gli standard di specie e/o di razza (Malcolm et al., 2018).

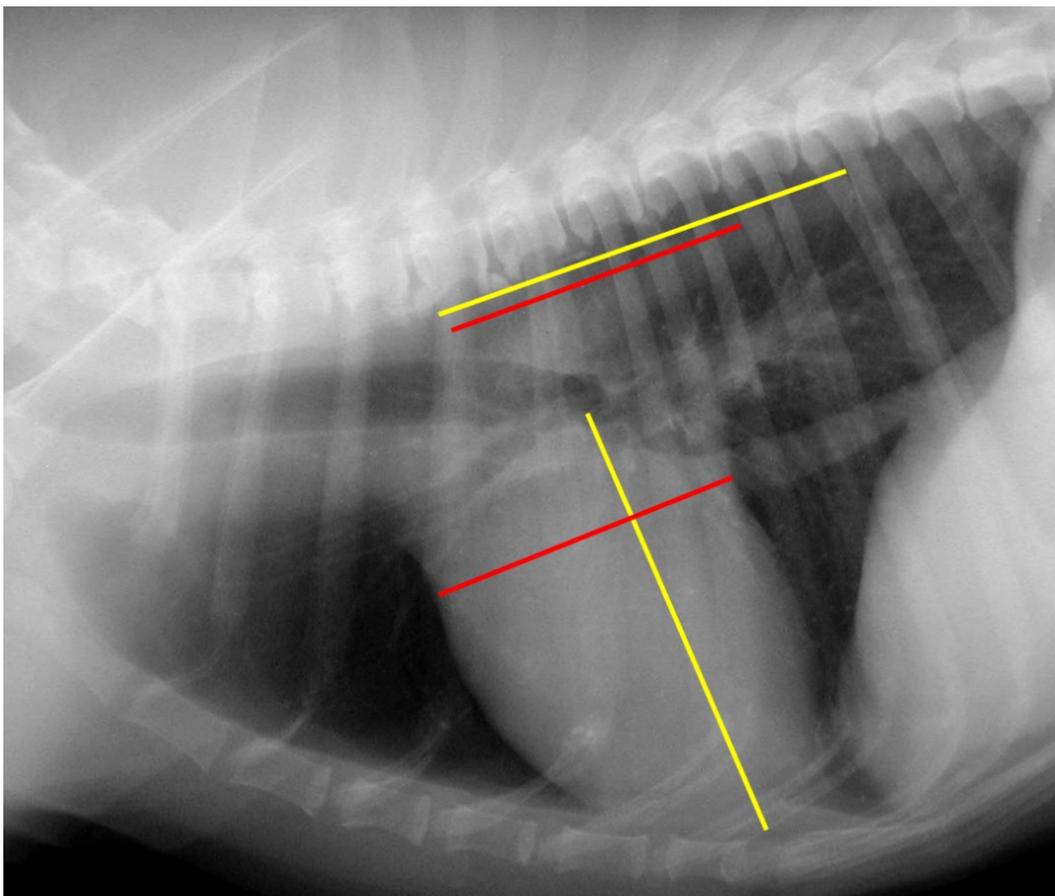
L'indagine radiografica fornisce un'immagine del torace nella sua complessità (cuore, polmoni e mediastino), inoltre, può servire per valutare eventuali segni indicativi di edema polmonare e per ricercare la contemporanea presenza di patologie respiratorie, neoplasie polmonari, malattie tracheobronchiali o polmoniti che potrebbero essere la causa di segni clinici quali dispnea o tosse. Infine, l'esame radiografico si è dimostrato utile per monitorare la progressione di MMVD già diagnosticata con altre metodiche. Rispetto all'ecocardiografia, la radiografia toracica è ampiamente disponibile, economica e considerata parte delle procedure *reference standard* per la diagnosi di CHF sinistra (Borgarelli et al., 2012).

Il *vertebral heart score* (VHS) è un parametro utilizzato per ottenere una misurazione standardizzabile della dimensione cardiaca a partire da una proiezione radiografica latero-laterale del torace. Si tratta di un valore numerico che deriva dal rapporto tra la somma della lunghezza e della larghezza della *silhouette* cardiaca e la lunghezza delle vertebre toraciche misurate a partire dal margine craniale della quarta. La lunghezza del cuore o asse maggiore (L) viene misurata dalla carena al punto più distale dell'apice cardiaco, la larghezza del cuore o asse minore (S) è perpendicolare all'asse maggiore e attraversa il cuore nel punto di massima larghezza (vedi **Figura 4**).

$$VHS = \frac{\text{asse maggiore } L + \text{asse minore } S}{\text{lunghezza } T4}$$

Il *vertebral heart score*, dunque, è espresso in “unità di corpo vertebrale” (*vertebral body unit*, VBU)” e quantifica le dimensioni del cuore venendo influenzato solo marginalmente della taglia o dello stato di nutrizione dell'animale (Stepien et al., 2020).

Il VHS normale per animali mesomorfi è compreso tra  $9,7 \pm 0,5$ , ma esistono poi numerosi valori specifici per diverse razze canine (Buchanan e Bucheler, 1995).



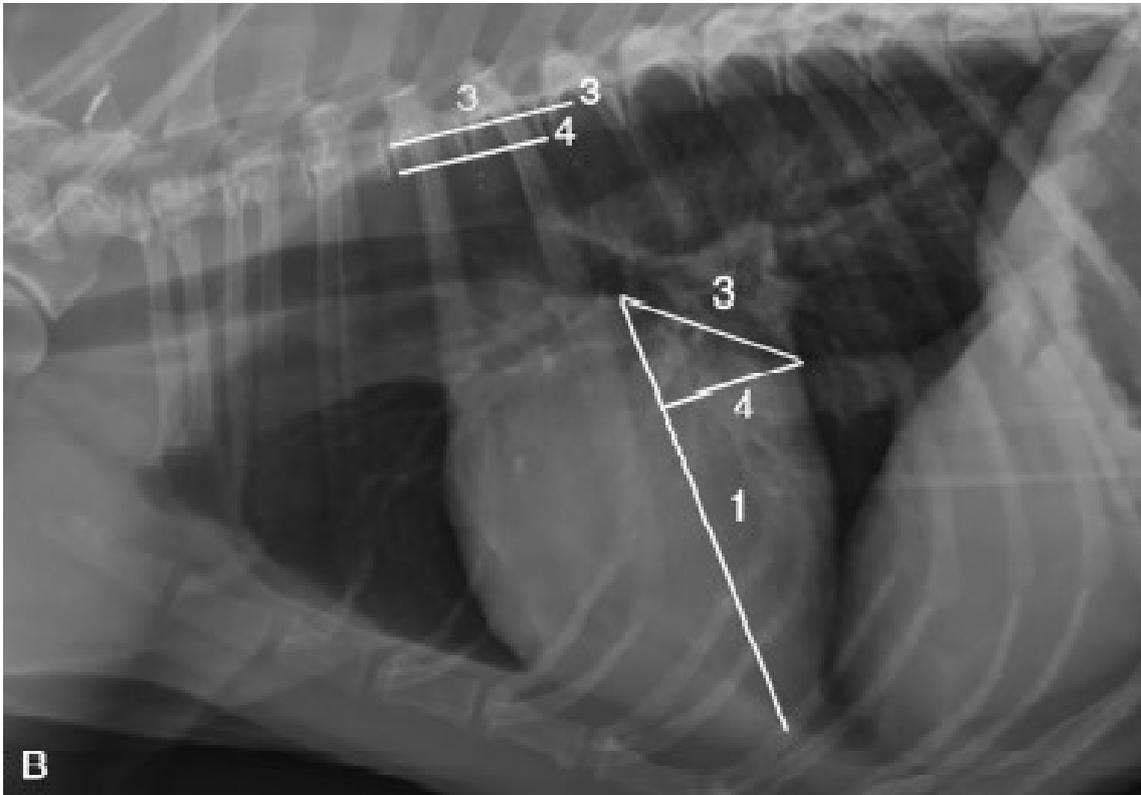
**Figura 4.** Radiografia toracica in proiezione latero laterale di un cane meticcio maschio di 10 anni. Il segmento giallo rappresenta la lunghezza del cuore misurata dal margine ventrale della carena all'apice cardiaco. Il segmento rosso rappresenta la larghezza del cuore misurata nel punto più ampio con una linea perpendicolare alla precedente. La somma dei due segmenti viene rapportata alla lunghezza di T4 per ottenere il punteggio di VHS. (dall'archivio dell'UO di Cardiologia dell'OVUD UniPD).

Più recentemente, è stata introdotta un'altra tecnica di valutazione radiografica delle dimensioni del cuore in corso di patologie causa di ingrandimento cardiaco ovvero il *vertebral left atrial size* (VLAS). Si tratta di una misurazione radiografica in VBU dell'atrio sinistro e quantifica la distanza tra la porzione ventrale della carena e il punto di intersezione tra la sagoma cardiaca e la vena cava caudale (vedi **Figura 5**).

Il *vertebral left atrial size* è una misurazione altamente riproducibile che ha una moderata correlazione positiva con le misurazioni ecocardiografiche della dimensione dell'atrio sinistro. Pertanto, costituisce una misurazione quantitativa affidabile della dimensione dell'atrio sinistro che può essere particolarmente utile per i veterinari che non hanno un accesso immediato all'ecocardiografia.

Valori di VLAS maggiori o uguali a 2,3 VBU possono essere utilizzati come indicatore radiografico dell'ingrandimento dell'atrio sinistro, per questo motivo i cani con VLAS  $\geq$

2,3 VBU probabilmente sono affetti da MMVD e presentano già delle conseguenze emodinamicamente importanti (Malcolm et al., 2018).



**Figura 5.** Radiografia toracica in proiezione latero laterale di un cane con MMVD. (1) lunghezza del cuore dalla carena all'apice, (3) distanza dalla carena all'intersezione della silhouette cardiaca con la vena cava caudale. Il VLAS è dato dal rapporto della misura (3) con la lunghezza di T4 (adattato da Stepien et al., 2020).

La radiografia con le relative misurazioni può costituire un valido strumento diagnostico soprattutto in situazioni di emergenza nel caso di cani con tosse o difficoltà respiratoria per capire rapidamente se la causa è una patologia a carico delle vie aeree o se è in corso un episodio di edema polmonare cardiogeno.

In generale, se disponibile, l'ecocardiografia è l'esame elettivo per la diagnosi e la stadiazione di MMVD.

L'esame ecocardiografico transtoracico è considerato la metodica non invasiva *reference standard* per la diagnosi di MMVD. Tale esame, infatti, permette di confermare la diagnosi, di escludere la presenza di malattie concomitanti, di valutare la severità dell'ingrandimento atrioventricolare sinistro e del MR e di riconoscere la presenza di complicazioni quali la rottura delle corde tendinee e/o dell'atrio sinistro o la presenza di

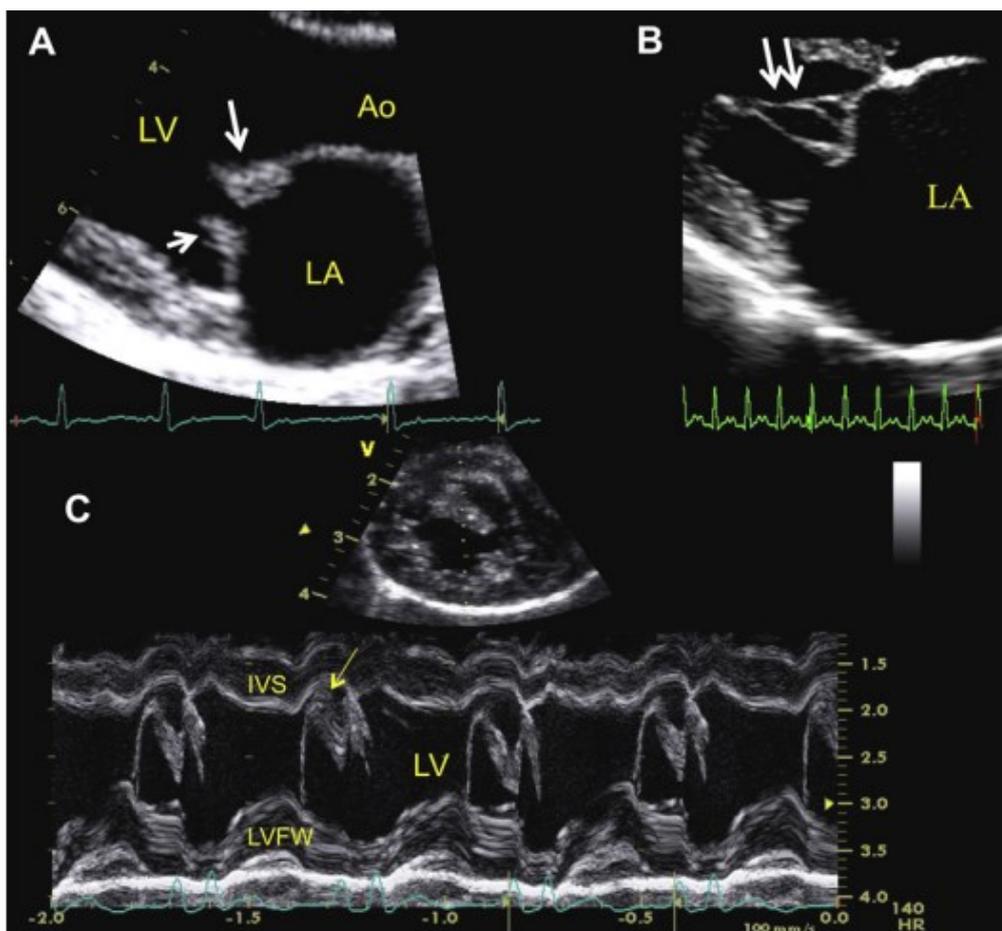
ipertensione polmonare. A causa del sovraccarico di volume e dei complessi cambiamenti emodinamici associati alla progressione della malattia, il rilevamento della disfunzione miocardica in corso di MMVD cronica rimane ancora difficilmente indagabile (Chetboul e Tissier, 2012).

Le alterazioni della valvola mitralica e dello stato emodinamico dovute a MMVD sono più facilmente visibili utilizzando la proiezione parasternale destra asse lungo a quattro camere o la proiezione in asse lungo ottimizzata per il tratto d'efflusso ventricolare sinistro (proiezione *reference standard*). Altre immagini possono essere acquisite utilizzando le proiezioni parasternale destra in asse corto o parasternale sinistra apicale. Le camere cardiache possono essere visualizzate con la tecnica bidimensionale (2D) o M-mode, mentre la valutazione dei flussi richiede l'utilizzo delle tecniche Doppler.

L'esame ecocardiografico standard in corso di MMVD include la valutazione della morfologia delle valvole, del MR e delle dimensioni dell'atrio e del ventricolo sinistro; infine, è importante il calcolo dei parametri di contrattilità miocardica e l'analisi del flusso trans-mitralico.

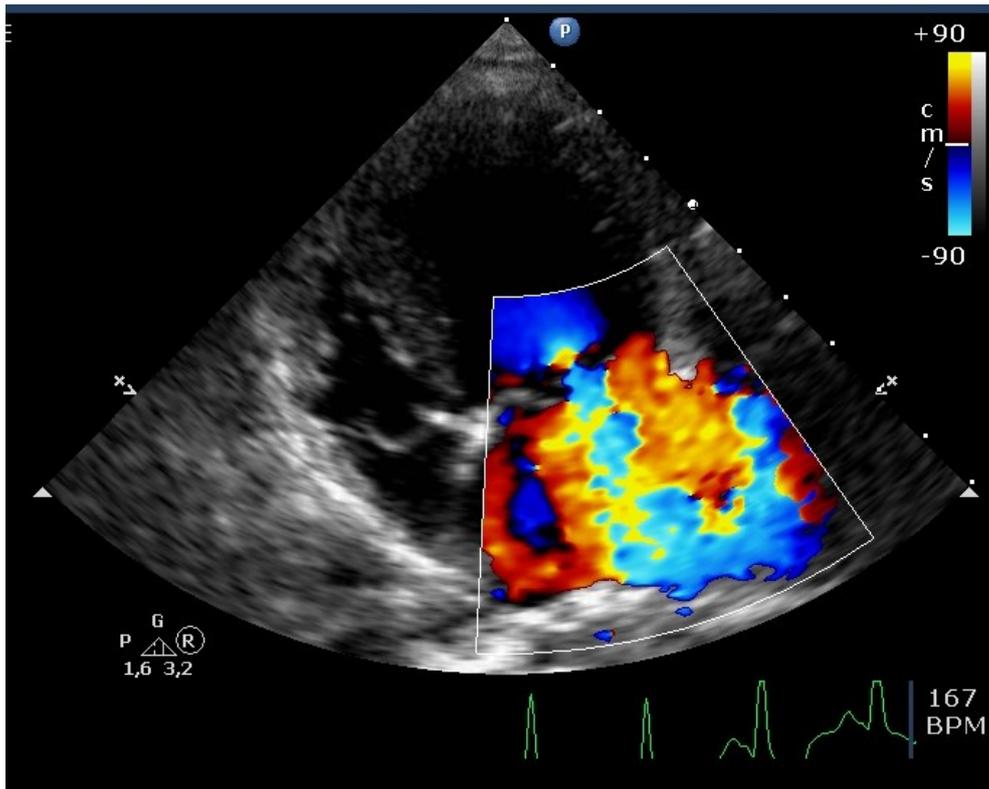
Le lesioni macroscopiche della valvola mitrale evidenziabili con l'esame ecocardiografico sono innanzitutto caratterizzate da piccoli noduli lisci sui margini dei lembi valvolari e da corde tendinee ispessite. Le lesioni nodulari si collocano soprattutto sul lembo anteriore e diventano più spesse e più disomogenee con il progredire della malattia (vedi **Figura 6**) (Chetboul e Tissier, 2012).

Altri aspetti comunemente riscontrati in corso di MMVD sono l'anormale appiattimento sistolico di uno o di entrambi i lembi della valvola mitrale e il prolasso della valvola mitrale che è definito come uno spostamento sistolico superiore e posteriore anormale dei lembi mitralici dal ventricolo sinistro nell'atrio sinistro durante la sistole (Terzo et al., 2010).



**Figura 6.** Immagini ecocardiografiche ottenute da tre cani affetti da MMVD. (A) e (B) Proiezione parasternale destra 2D quattro camere in asse lungo. (C) Proiezione parasternale destra in asse corto a livello della valvola mitrale in M-mode. In (A) le frecce indicano le lesioni nodulari che colpiscono i lembi valvolari; in (B) le frecce indicano l'ispessimento della corda tendinea. In (C) la freccia indica l'ispessimento irregolare del lembo valvolare visibile anche in M-Mode e l'accorciamento della distanza tra valvola mitrale e setto interventricolare indicativa di uno stato ipercinetico. Ao: aorta, IVS: setto interventricolare (interventricular septum), LA: atrio sinistro (left atrium), LV: ventricolo sinistro (left ventriculum), LVFW: parete libera del ventricolo sinistro (left ventricular free wall). (adattato da Chetboul e Tissier, 2012).

La valutazione ecocardiografica della gravità del MR è di fondamentale importanza nei cani con MMVD poiché riflette direttamente la conseguenza emodinamica primaria dell'apposizione incompleta dei lembi della valvola mitrale durante la sistole (vedi **Figura 7**).



**Figura 7.** Proiezione ecocardiografica parasternale sinistra apicale a quattro camere di un cane bassotto femmina di 12 anni. Con il Color Doppler è stato messo in evidenza il rigurgito attraverso la valvola mitralica che in sistole occupa gran parte dell'atrio sinistro. (dall'archivio dell'UO di Cardiologia dell'OVUD UniPD).

Il MR può essere misurato in modo semi-quantitativo o quantitativo.

Uno dei metodi semi-quantitativi comunemente usati per valutare la gravità di MR ricorre alla modalità *color-flow* Doppler per calcolare il rapporto massimo tra il segnale dell'area del getto rigurgitante e l'area dell'atrio sinistro (rapporto ARJ/LAA ovvero *regurgitant jet area signal to left atrium area*). Sulla base di questo metodo, il rigurgito è generalmente considerato lieve se il rapporto ARJ/LAA è inferiore a 20 – 30%, moderato se è compreso tra 30% e 70% o grave se è superiore a 70%. Questa valutazione è molto rapida e i dati sono facilmente acquisibili e riproducibili anche se il cane è sveglio. Tuttavia, la tecnica consente solo una semi-quantificazione di MR, poiché il rapporto ARJ/LAA confronta due aree senza alcuna valutazione del volume di rigurgito. Inoltre, il rapporto ARJ/LAA può essere influenzato da diversi fattori, tra cui la pressione arteriosa sistemica, la pressione atriale sinistra, l'orientamento spaziale del getto (i getti eccentrici che colpiscono la parete possono apparire più piccoli dei getti diretti centralmente di

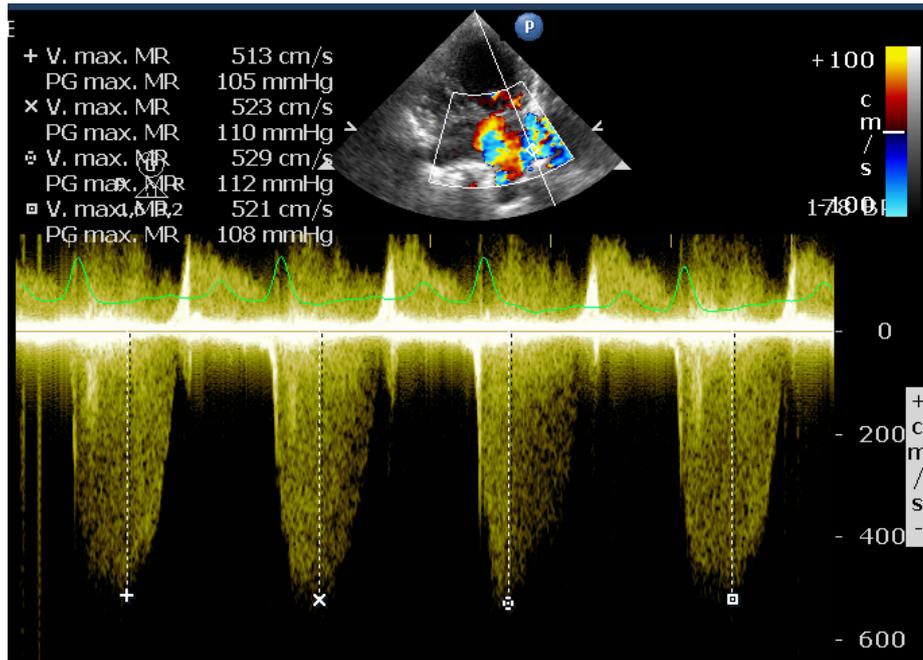
gravità emodinamica simile), la frequenza di ripetizione dell'impulso e le impostazioni dell'ecografo per l'acquisizione dell'immagine (Muzzi et al., 2003).

Per ottenere una valutazione più accurata di MR si può ricorrere ad una tecnica quantitativa come il metodo PISA (*Proximal Isovelocity Surface Area*), chiamato anche metodo di convergenza del flusso. Questo tipo di indagine è più indaginoso del precedente, ma è ugualmente ripetibile e riproducibile nel cane sveglio. Il suo principale vantaggio è la più affidabile discriminazione della gravità di MR rispetto al metodo di mappatura color Doppler, il metodo PISA infatti consente di misurare la portata attraverso l'orifizio del rigurgito, di calcolare il volume del rigurgito e di valutare la frazione del rigurgito (*regurgitant fraction*, RF) cioè la percentuale del volume sistolico espulso in atrio sinistro durante la sistole.

L'insufficienza mitralica è generalmente considerata lieve o moderata per valori di RF superiori rispettivamente al 30-50% e grave se RF supera 75% (Kittleson e Brown, 2003). In diversi studi effettuati su cani con MMVD, RF è risultato significativamente correlato con alcuni parametri clinici (es., classe *International Small Animal Cardiac Health Council* o grado del soffio cardiaco), con diversi marker ecocardiografici (tra cui LA/Ao e pressione arteriosa polmonare sistolica) e con la concentrazione ematica del biomarker NT- proBNP (Chetboul et al., 2009). Inoltre, poiché esiste una correlazione positiva tra RF e il rapporto ARJ/LAA, quest'ultimo può essere utilizzato per valutare la gravità di MR e può essere utile in fase di *follow-up* longitudinale della patologia (Gouni et al., 2007).

Il profilo di flusso del rigurgito mitralico sistolico, valutato con la modalità Doppler a onda continua, riflette la pressione atriale sinistra, la funzione sistolica del ventricolo sinistro, il precarico e la pressione arteriosa sistemica.

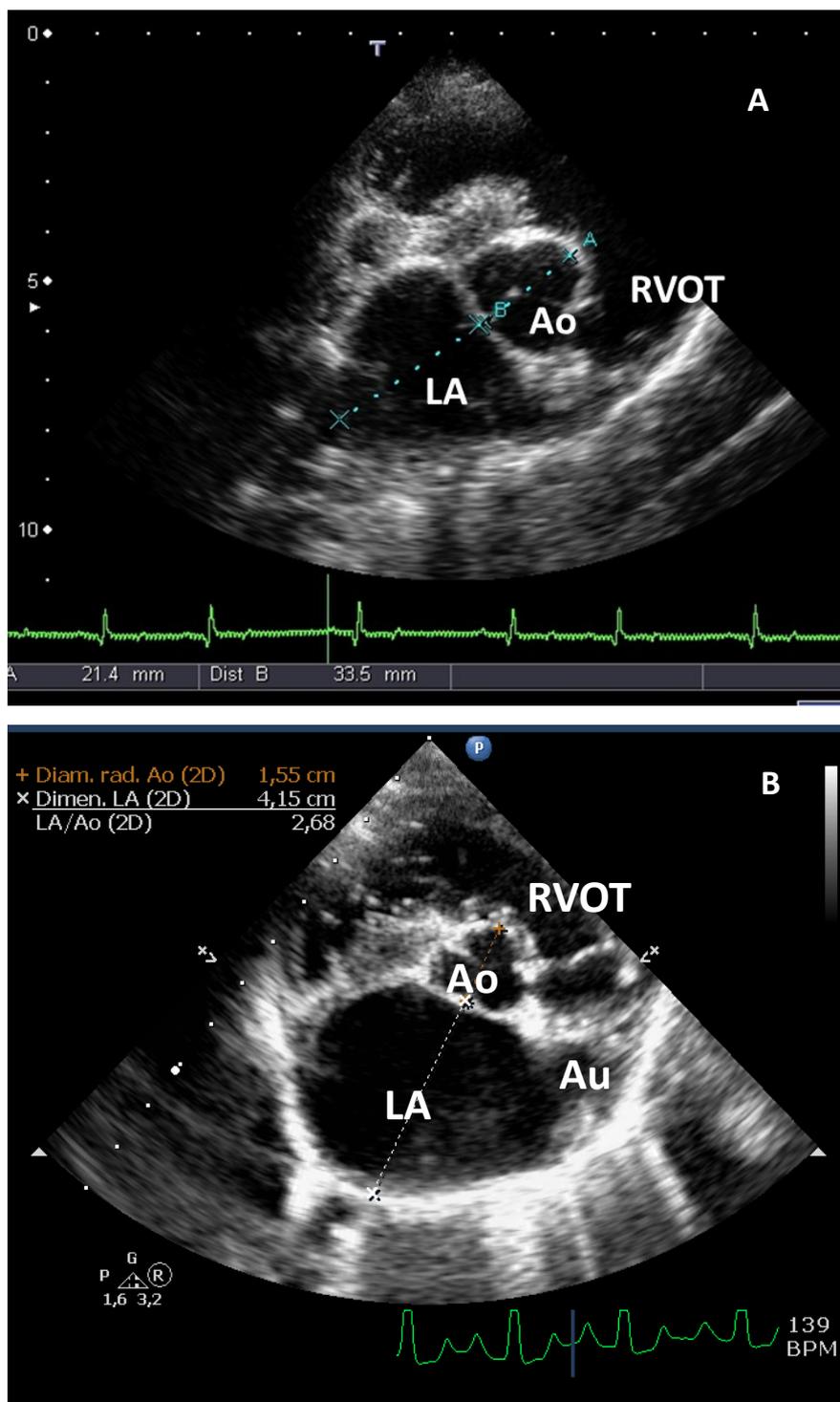
La velocità di picco del rigurgito mitralico olosistolico è solitamente compresa tra 5 e 6 m/s e corrisponde ad un gradiente di pressione atrioventricolare di 100 mmHg o leggermente superiore, secondo l'equazione di Bernoulli (Chetboul e Tissier, 2012) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Tracciato Doppler ad onda continua del getto rigurgitante attraverso la valvola mitralica in un cane affetto da MMVD. La velocità di picco è superiore a 5 m/s (media = 5,21 m/s) e il profilo del flusso è simmetrico. (dall'archivio dell'UO di Cardiologia dell'OVUD UniPD).

Il sovraccarico di volume determinato da un rigurgito mitralico cronico ed emodinamicamente significativo determina un ingrandimento dell'atrio sinistro valutato attraverso il rapporto tra diametro dell'atrio sinistro e diametro dell'aorta (*left atrium/aorta*, LA/Ao). La scelta di rapportare il diametro atriale al diametro aortico è legata alla necessità di ottenere una misura standardizzabile, ripetibile e non dipendente dal peso o dalla taglia dell'animale (vedi **Figura 9**). Questo indice è considerato nella norma per valori inferiori a 1,6 (Hansson et al., 2002).

Altri segni indiretti di elevata pressione dell'atrio sinistro sono rappresentati da una deformità del setto interatriale, dall'aumento del diametro delle vene polmonari e dalla presenza di aritmie atriali (Chetboul e Tissier, 2012).



**Figura 9.** Immagini ecocardiografiche 2D ottenute in proiezione parasternale destra in asse corto a livello della valvola aortica in fase telediastolica. Ao: aorta, LA: atrio sinistro (left atrium), RVOT: tratto di efflusso del ventricolo destro (right ventricular outflow tract), Au: auricola sinistra (left auricle).  
 (A) Cane meticcio maschio anni 7. Il rapporto LA/Ao rientra nel range di normalità, quindi il valore di questo parametro non è indicativo di rimodellamento cardiaco.  
 (B) Cane meticcio maschio anni 12. L'atrio sinistro è decisamente aumentato di dimensioni, il rapporto LA/Ao è pari a 2.68.  
 (dall'archivio dell'UO di Cardiologia dell'OVUD UniPD).

Con il peggioramento del rigurgito mitralico, il sovraccarico di volume determina anche un aumento delle dimensioni telediastoliche del ventricolo sinistro. L'ingrandimento ventricolare riflette un marcato aumento del precarico e può a sua volta peggiorare il MR a causa della dilatazione anulare e di un alterato allineamento dei muscoli papillari. I volumi e i diametri del ventricolo sinistro diastolici possono essere valutati mediante ecocardiografia M-mode e 2D.

La frazione di eiezione (*ejection fraction*, EF) e la frazione di accorciamento (*fractional shortening*, FS) sono i due indici più comunemente usati per valutare la funzione miocardica sistolica nel cane mediante ecocardiografia convenzionale ed entrambe queste grandezze sono espresse come percentuali (Bonagura e Schober, 2009).

EF rappresenta la percentuale del volume di sangue contenuto nel ventricolo sinistro che viene espulsa dalla camera cardiaca durante la sistole. È quindi definita dalla percentuale di variazione del volume del ventricolo sinistro tra la fase diastolica e sistolica.

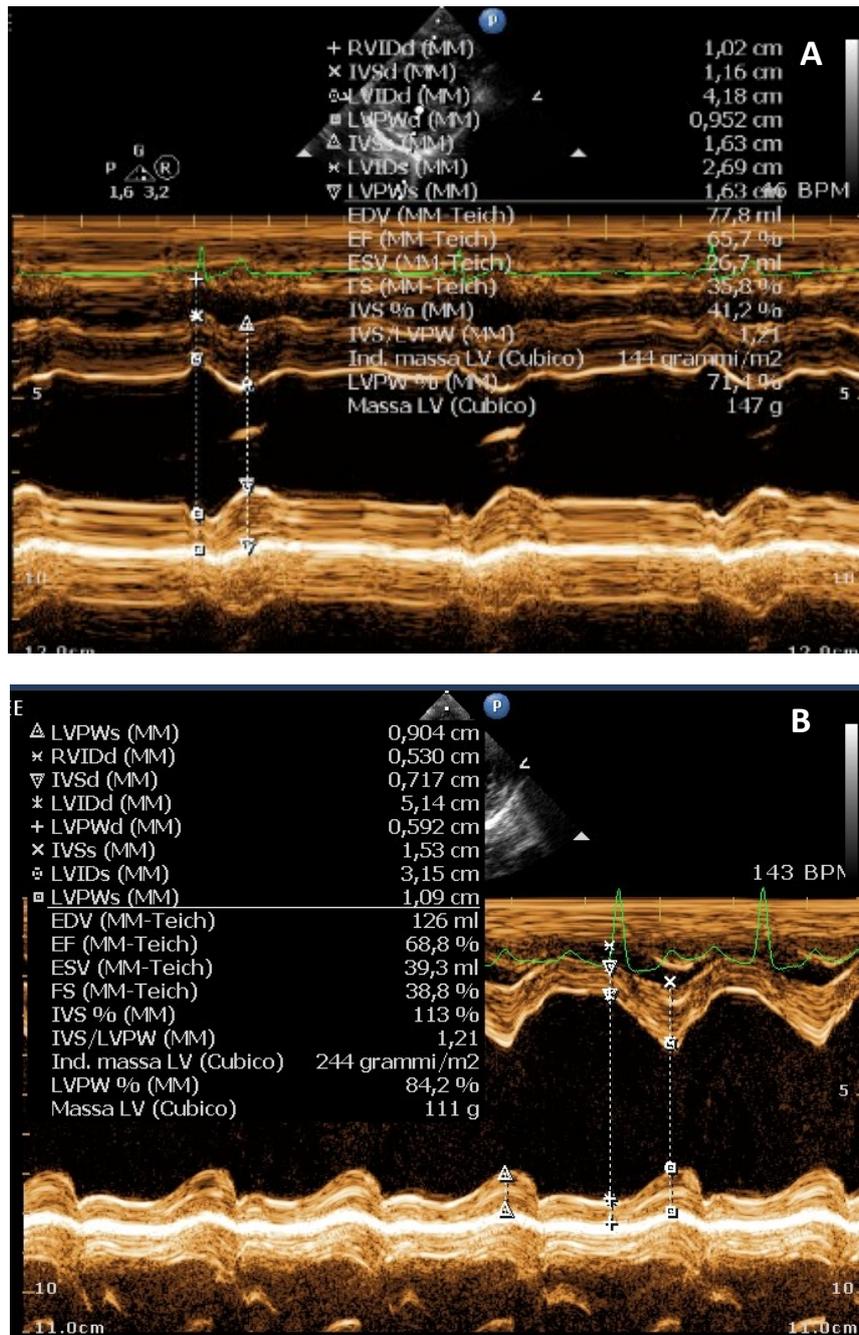
$$EF\% = \frac{(EDV - ESV) \times 100}{EDV}$$

I valori del volume sistolico (*end systolic volume*, ESV) e del volume diastolico (*end diastolic volume*, EDV) del ventricolo sinistro sono comunemente acquisiti a partire da una proiezione parasternale destra o sinistra bidimensionale attraverso il metodo di Simpson. Un valore basso di EF è coerente con una diminuzione della funzione sistolica.

FS corrisponde a una valutazione unidimensionale della funzione sistolica miocardica; è definita dalla variazione percentuale dei diametri del ventricolo sinistro tra la fase diastolica e sistolica.

$$FS\% = \frac{(LVDD - LVSD) \times 100}{LVDD}$$

I valori del diametro sistolico (*left ventricular systolic diameter*, LVSD) e del diametro diastolico (*left ventricular diastolic diameter*, LVDD) del ventricolo sinistro sono solitamente valutati mediante ecocardiografia M-mode. I valori normali di FS sono inclusi tra 30 e 49% (Serres et al., 2008). Un valore di FS basso è coerente con una contrattilità ridotta.



**Figura 10.** Immagini ecocardiografiche M-mode ottenute in proiezione parasternale destra in asse corto a livello dei muscoli papillari. LVPWs/d: parete posteriore del ventricolo sinistro in telesistole o in telediastole (left ventricular posterior wall end systole/diastole), RVIDd: diametro interno del ventricolo destro in telediastole (right ventricle internal diameter), IVSs/d: setto interventricolare in sistole/diastole (interventricular septal), LVIDs/d: diametro interno del ventricolo sinistro in telesistole/diastole (left ventricular internal diameter), EDV: volume telediastolico (end diastolic volume), EF: frazione di eiezione (ejection fraction), ESV: volume telesistolico (end systolic volume), FS: frazione di accorciamento (A) Cane meticcio femmina anni 5: Il cane non è affetto da MMVD, l'esame ecocardiografico evidenzia un pattern fisiologico con valori di FS ed EF normali (B) Cane meticcio maschio anni 13: Il cane è affetto da MMVD, l'esame ecocardiografico evidenzia un importante aumento delle dimensioni del ventricolo sinistro associato ad un lieve aumento di FS ed EF (dall'archivio dell'UO di Cardiologia dell'OVUD UniPD).

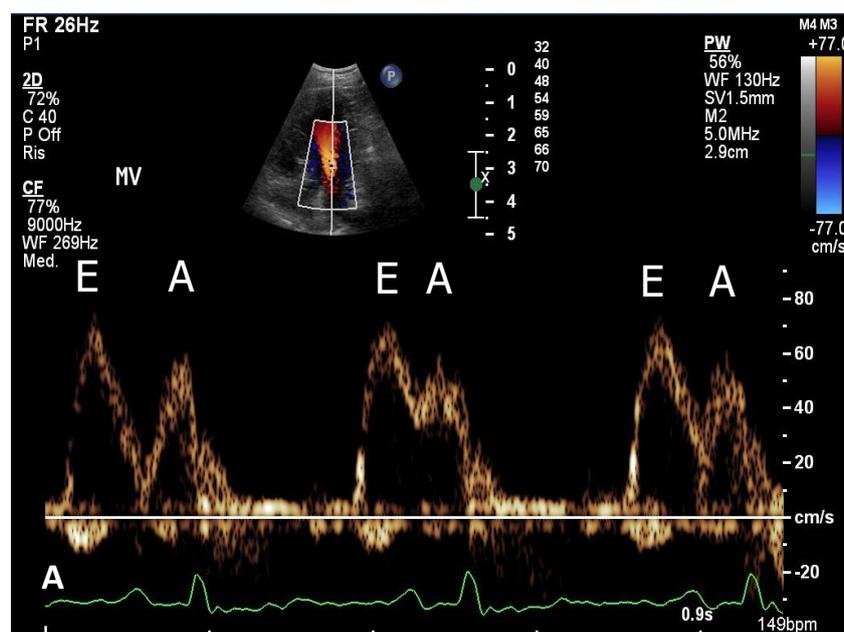
Un'importante limitazione sia di FS che di EF è che questi indici non dipendono solo dalla contrattilità miocardica intrinseca, ma anche dalle condizioni di precarico e postcarico cardiaco. In corso di MMVD il precarico aumenta per il rigurgito mitralico, inoltre, le lesioni della valvola mitralica creano un nuovo percorso patologico a bassa resistenza per l'espulsione del sangue dal ventricolo sinistro (diminuzione del postcarico e assenza del periodo di contrazione isovolumetrica) (Chetboul e Tissier, 2012).

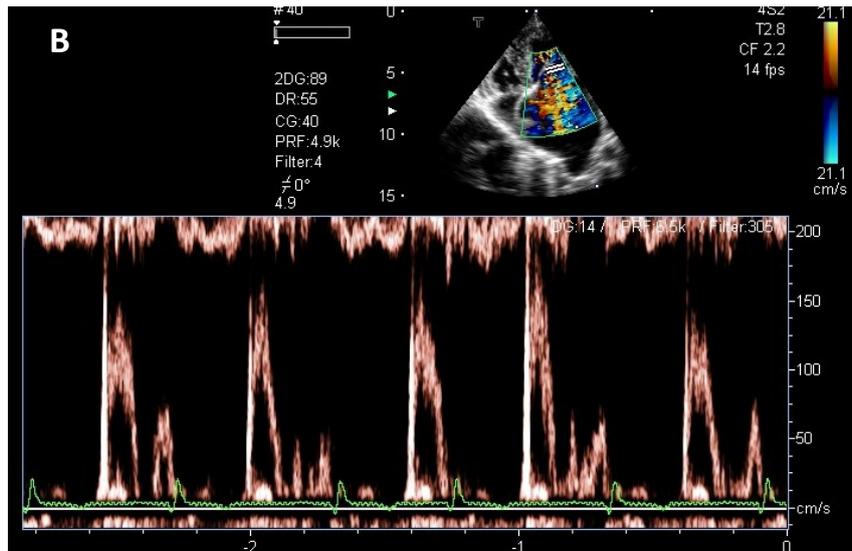
Per questi motivi, la progressione di MMVD è caratterizzata principalmente da uno stato iperdinamico del ventricolo sinistro con elevate FS e EF dovute al sovraccarico di volume, alla diminuzione del post-carico e all'aumento del tono simpatico.

Il riscontro di una FS lievemente aumentata o nei limiti della norma e di un diametro telesistolico normalizzato aumentato deve quindi essere interpretato come indicativo di una disfunzione sistolica significativa.

Il profilo del flusso trasmitralico normale, valutato con la modalità Doppler a onda pulsata e registrato a livello dei margini ventricolari dei lembi valvolari mitralici, è caratterizzato da un'onda E precoce e da un'onda A diastolica tardiva correlata alla contrazione atriale. Il rapporto tra le due onde (E/A) solitamente è superiore a uno e decresce con l'età (Bonagura e Schober, 2009).

Il profilo del flusso attraverso la valvola mitralica riflette la funzione diastolica (rilassamento, compliance e volume) e la pressione di riempimento del ventricolo sinistro (vedi **Figura 11**).





**Figura 11.** Immagini ecocardiografiche M-mode ottenute in proiezione parasternale sinistra apicale a quattro camere con tracciato Doppler a onda pulsata del flusso transmitralico.  
 (A) Cane meticcio maschio anni 6. L'onda E presenta una velocità nettamente inferiore a 1 m/s (compresa tra 70 e 80 cm/s)  
 (B) Cane meticcio maschio anni 13. L'onda E è prominente e presenta velocità elevate (tra 1,3 e 1,5 m/s).  
 (dall'archivio dell'UO di Cardiologia dell'OVUD UniPD).

Un aumento della velocità dell'onda E del flusso trans-mitralico e del rapporto E/A suggerisce la presenza di un quadro di tipo restrittivo del riempimento ventricolare. Un'onda E ad alta velocità (oltre 1,25 – 1,5 m/s) dunque è indicativa di una pressione atriale elevata (Bonagura e Schober, 2009).

Una velocità dell'onda E del flusso trans-mitralico superiore a 1,2 m/s è stata associata a un aumentato rischio di mortalità cardiaca o di progressione a uno stadio più avanzato di malattia, sia in cani affetti da malattia preclinica, sia in animali con scompenso cardiaco (Sargent et al., 2015).

Per quanto riguarda gli aspetti laboratoristici, in corso di patologia cardiaca vengono indagati i valori del frammento N-terminale del propeptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) e della troponina I cardiaca (cTnI). Entrambi questi parametri presentano un valore prognostico significativo per le malattie cardiache in medicina veterinaria (Hezzell et al., 2012). NT-proBNP appartiene al sistema dei peptidi natriuretici, riflette il sovraccarico di volume ed è influenzato da altri meccanismi ormonali come il RAAS, al contrario l'aumento di cTnI è determinato dal danno miocardico secondario al rimodellamento cardiaco in corso di MMVD (Falk et al., 2013).

La concentrazione ematica di cTnI riflette la presenza di fibrosi all'interno del miocardio e di aterosclerosi in cani con MMVD, l'aumento del livello circolante probabilmente è dovuto a un rilascio continuo di troponine a causa dei processi di rimodellamento (Falk et al., 2013). Tuttavia, secondo studi più recenti, la concentrazione plasmatica di cTnI ha una capacità discriminatoria complessiva inferiore rispetto ad altri biomarker laboratoristici (Ogawa et al., 2021).

Le concentrazioni plasmatiche di NT-proBNP sono elevate in cani con MMVD in stadio preclinico, ma con dimensione del getto di rigurgito mitralico superiore a 80% e sono marcatamente elevate nei cani con segni clinici di insufficienza cardiaca. Le concentrazioni plasmatiche di NT-proBNP aumentano con l'ingrandimento dell'atrio sinistro a prescindere dalla presenza di segni clinici. Tra i biomarker cardiaci, la concentrazione plasmatica di NT-proBNP è il parametro più indicativo di dilatazione cardiaca, inoltre è il fattore predittivo più significativo per CHF nei cani con MMVD (Ogawa et al., 2021).

## **2.5. CLASSIFICAZIONE ACVIM**

*L'American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)* nel 2009 ha formulato le prime linee guida per la diagnosi e il trattamento di MMVD (Atkins et al., 2009). Nel 2019 le linee guida ACVIM sono state aggiornate e ridefinite (Keene et al., 2019). I pazienti affetti da malattia cronica degenerativa valvolare sono stati suddivisi in quattro classi sulla base di aspetti riscontrabili clinicamente e mediante tecniche di diagnostica per immagini.

Il sistema di stadiazione è stato progettato per sviluppare programmi di screening per MMVD nei cani appartenenti a razze a rischio di sviluppare la malattia cardiaca; per implementare interventi che possono ridurre il rischio di sviluppo o progressione della malattia; per identificare i cani con MMVD nelle prime fasi della malattia in modo da poterli gestire in modo più efficiente con trattamenti medici o chirurgici e per individuare i cani sintomatici con insufficienza cardiaca avanzata causata da MMVD refrattaria al trattamento medico convenzionale o gestita con terapia medica domiciliare. Questi ultimi pazienti richiedono strategie di trattamento aggressive e innovative, come l'intervento

chirurgico, o cure di fine vita potenzialmente palliative o di tipo hospice (Keene et al., 2019).

- Classe A: identifica i cani ad alto rischio di sviluppare MMVD e/o insufficienza cardiaca, ma che al momento della visita non presentano alterazioni strutturali cardiache identificabili (per esempio, in questa categoria si trovano i CKCS o altre razze predisposte senza evidenza di soffio cardiaco).

I cani di piccola taglia, comprese le razze con nota predisposizione per MMVD (Cavalier King Charles Spaniel, Bassotti, Barboncini nani e toy) devono essere sottoposti a valutazioni regolari (auscultazione annuale da parte del veterinario) come parte dell'assistenza sanitaria di routine.

I proprietari di cani da riproduzione o di soggetti particolarmente a rischio possono scegliere di partecipare a eventi di screening annuali condotti da cardiologi certificati dal consiglio ACVIM in occasione delle mostre canine o di altri eventi sponsorizzati dalla loro associazione di razza.

- Classe B: identifica i cani con cardiopatia strutturale evidenziata mediante tecniche di diagnostica per immagini, ma che non hanno mai sviluppato segni clinici causati da insufficienza cardiaca.

In tutti i pazienti con segnalamento, anamnesi e reperti clinici indicativi di MMVD è utile effettuare uno studio radiografico del torace per valutare eventuali segni di rimodellamento cardiaco derivanti dall'alterazione emodinamica e per ottenere un'immagine basale rappresentativa in un momento in cui il paziente è asintomatico per MMVD. I pazienti con MMVD hanno frequentemente malattie tracheali o bronchiali concomitanti, per questo motivo i reperti di *imaging* raccolti in un momento in cui il cane è asintomatico possono aumentare la capacità di differenziare radiograficamente cause cardiache e non cardiache a fronte di futuri segni clinici (tosse o dispnea).

Per tutti i pazienti che rientrano nella categoria precedentemente definita, è consigliabile misurare la pressione sanguigna per identificare o escludere un'ipertensione sistemica concomitante.

Le linee guida ACVIM raccomandano poi l'esecuzione di un esame ecocardiografico da parte di un operatore esperto. L'esame ecocardiografico può confermare la presenza di

MMVD, quantificare gli ingrandimenti delle camere e la funzione cardiaca, fornire stime generali delle pressioni di riempimento del ventricolo sinistro e identificare comorbidità e complicanze del rigurgito mitrale cronico (per esempio ipertensione polmonare, difetto acquisito del setto interatriale, versamento pericardico conseguente a rottura atriale...).

L'identificazione ecocardiografica di un lieve ingrandimento atriale o ventricolare sinistro può essere difficile e può essere richiesto il confronto con i valori normali specifici della razza (Keene et al., 2019).

La classe B è ulteriormente suddivisa in due sottoclassi in base alla presenza o meno di segni di rimodellamento cardiaco.

- Classe B1: identifica cani asintomatici che non hanno evidenze radiografiche o ecocardiografiche di rimodellamento cardiaco come conseguenza di MMVD
- Classe B2: identifica cani asintomatici che presentano un rigurgito della valvola mitrale più avanzato ed emodinamicamente più grave rispetto alla classe B1; in questi animali si riscontrano reperti radiografici ed ecocardiografici di ingrandimento atriale e ventricolare sinistro.

I cani in stadio B sono dunque caratterizzati da uno spettro di reperti di *imaging* che va da dimensioni atriali e ventricolari sinistre radiograficamente ed ecocardiograficamente normali con normale funzione sistolica a quadri con evidenza ecocardiografica o radiografica di ingrandimento atriale e ventricolare sinistro.

I criteri di appartenenza alla classe B2 includono:

- Intensità del soffio  $\geq 3/6$ ;
- Rapporto LA/Ao in proiezione parasternale destra in asse corto in fase di diastole precoce  $\geq 1,6$ ; (Hansson et al., 2002)
- Diametro interno ventricolare sinistro in diastole, normalizzato per peso corporeo (LVDDn)  $\geq 1,7$ ; (Cornell et al., 2004)
- VHS  $> 10,5$ . (Lamb et al., 2001)

Idealmente, tutti questi criteri dovrebbero essere soddisfatti prima di iniziare un trattamento farmacologico. Tra gli aspetti considerati per la stadiazione, l'evidenza ecocardiografica di ingrandimento atriale e ventricolare sinistro è considerata il modo più

affidabile per identificare i cani che potrebbero trarre beneficio dalla terapia farmacologica.

I criteri definitivi per l'identificazione radiografica dello stadio B2 non sono attualmente disponibili. In assenza di misurazioni ecocardiografiche, una chiara evidenza radiografica di cardiomegalia ( $VHS \geq 11,5$ ) o un'evidenza radiografica di accelerazione crescente del processo di ingrandimento cardiaco possono sostituire l'ecocardiografia quantitativa per identificare lo stadio B2.

Il VLAS è un nuovo indice radiografico di ingrandimento dell'atrio sinistro. Attualmente, sono in corso degli studi per determinare un valore di VLAS che possa definire abbastanza accuratamente l'entità del rimodellamento cardiaco in modo da poter stadiare con precisione la gravità della malattia cardiaca. Ad oggi, in assenza di esame ecocardiografico, si ritiene che valori di VLAS maggiori o uguali a 3,1 identifichino lo stadio B2. Un *cut off* di VLAS pari a 2,5 può essere utilizzato per individuare gli animali che hanno necessità di un approfondimento ecocardiografico per poter stadiare in modo definitivo la patologia cardiaca (Mikawa et al., 2020).

- Classe C: identifica i cani con segni clinici presenti o passati di insufficienza cardiaca causata da MMVD, ma che non sono refrattari al trattamento standard. Questi pazienti continuano a essere classificati come classe C anche dopo il miglioramento o la completa risoluzione dei loro segni clinici con la terapia farmacologica. In casi eccezionali sottoposti a riparazione chirurgica della valvola mitrale, è giustificata la riclassificazione allo stadio B.

Il cane nello stadio C presenta i segni clinici tipici di insufficienza cardiaca congestizia sinistra e un'anamnesi che può includere tachipnea, irrequietezza, distress respiratorio o tosse. Nei soggetti anziani di piccola o media taglia, che sono maggiormente predisposti allo sviluppo di MMVD, non è infrequente diagnosticare la presenza di patologie croniche a carico delle vie aeree inferiori, di conseguenza, la presenza di un soffio a livello apicale sinistro causato da rigurgito mitralico in un cane che tossisce non significa necessariamente che segni clinici, quali tosse o dispnea, siano il risultato di un quadro di CHF.

Nei cani con evidenza di ipertensione polmonare sintomatica (affaticamento, collasso o sincope, ascite da insufficienza cardiaca destra) i reperti Doppler spettrali possono confermare la diagnosi e guidare il processo decisionale terapeutico.

Le concentrazioni sieriche di NT-proBNP possono aggiungere utili evidenze quando si determina la causa dei segni clinici nei cani con MMVD: i cani con segni clinici causati da insufficienza cardiaca hanno concentrazioni sieriche di NT-proBNP più elevate rispetto ai cani in cui i segni clinici sono causati da malattia respiratoria primaria. Una concentrazione normale o quasi normale di NT-proBNP in un cane con segni clinici di tosse, dispnea o intolleranza all'esercizio suggerisce fortemente che l'insufficienza cardiaca non sia la causa dei segni clinici sopracitati (Oyama et al., 2009).

- Classe D: identifica i cani con MMVD allo stadio terminale, in cui i segni clinici di insufficienza cardiaca sono refrattari al trattamento standard (oltre 8 mg/kg di furosemide o un equivalente dosaggio di torasemide somministrati concomitantemente a pimobendan a 0.25 – 0.3 mg/kg, ACE inibitore a dosaggio standard e spironolattone a 2 mg/kg/die) oppure che richiedono una terapia antiaritmica.

## 2.6. PROGNOSI

La malattia da degenerazione mixomatosa della valvola mitralica ha una lenta progressione, di solito della durata di anni, ed è influenzata da fattori esterni quali stress, età di insorgenza e sviluppo di complicanze. I cani con lesioni valvolari minime possono restare stabili per anni e molti di essi non sviluppano mai sintomi di scompenso cardiaco nel corso della loro vita. La malattia, dunque, può essere caratterizzata da un lungo periodo preclinico. Tuttavia, i cani con MMVD in fase preclinica costituiscono un gruppo di animali molto eterogeneo (Borgarelli et al., 2012).

I fattori di rischio associati alla progressione della malattia o alla morte nei cani con MMVD includono età, sesso, intensità del soffio cardiaco, grado di prolasso valvolare, gravità delle lesioni valvolari, estensione del rigurgito della valvola mitrale, gravità di ingrandimento atriale sinistro e dell'ipertrofia eccentrica del ventricolo sinistro,

rottura delle corde tendinee e aumento della concentrazione di peptidi natriuretici come NT-proBNP (Borgarelli e Buchanan, 2012).

Anche gli aumenti della velocità dell'onda E trans-mitralica e della frequenza cardiaca a riposo sono moderatamente predittivi della velocità di progressione di MMVD e possono aiutare a identificare i cani a rischio di insufficienza cardiaca imminente. La velocità di variazione delle variabili ecocardiografiche e radiografiche può identificare gli animali a maggior rischio di insufficienza cardiaca o morte per causa cardiaca. Lo sviluppo di schemi di stratificazione del rischio veramente predittivi (sensibili e specifici), tuttavia, necessita di un ulteriore perfezionamento (Keene et al., 2019).

## 2.7. TRATTAMENTO

La scelta del piano terapeutico per i cani affetti da MMVD può essere effettuata sulla base dei criteri estremamente puntuali forniti dalla più recente pubblicazione delle linee guida ACVIM per la diagnosi e il trattamento della patologia in base alla classe di appartenenza (Keene et al., 2019).

### → Classe A

Per i pazienti di classe A non è raccomandato nessun trattamento farmacologico o dietetico.

I potenziali riproduttori non dovrebbero più essere usati per la riproduzione se durante la normale fascia di età riproduttiva vengono identificati un soffio o un'evidenza ecocardiografica di rigurgito mitralico.

### → Classe B1

Il trattamento farmacologico o dietetico non è raccomandato in questi cani perché nella fase iniziale della malattia, la progressione verso l'insufficienza cardiaca è incerta, inoltre è improbabile che si verifichino notevoli peggioramenti entro l'intervallo di valutazione raccomandato.

È opportuno effettuare una rivalutazione mediante ecocardiografia (o radiografia se l'ecocardiografia non è disponibile) entro 6 – 12 mesi.

## → Classe B2

Per gli animali in questo stadio, viene raccomandato il trattamento con pimobendan (inotropo positivo e vasodilatatore arterioso) ad un dosaggio di 0,25 - 0,3 mg/kg PO q12h. La scelta di impostare una terapia anche in animali in fase preclinica si basa sui risultati di uno studio del 2018 che valutava l'efficacia del pimobendan nel ritardare la comparsa di segni clinici in cani con ingrandimento cardiaco secondario a MMVD. Nei cani con MMVD preclinica trattati con pimobendan le dimensioni cardiache (valutate mediante gli indici LVDDn, LVDSn e LA/Ao) erano inferiori rispetto ai cani che non ricevevano alcuna terapia. Nel complesso, dunque, dallo studio emerge che gli animali trattati precocemente con pimobendan presentano un prolungamento del periodo preclinico e raggiungono lo stadio ACVIM successivo più tardivamente rispetto ai cani non trattati (Boswood et al., 2018).

Oltre al trattamento farmacologico, i cani in stadio B2 dovrebbero ricevere una dieta altamente appetibile e con una moderata restrizione di sodio. Il contenuto di proteine e di calorie dovrebbe essere sufficiente per mantenere una condizione corporea ottimale senza che l'animale vada incontro a sensibili variazioni di peso.

Per i pazienti in cui l'atrio sinistro è notevolmente aumentato di dimensioni negli esami di monitoraggio successivi alla prima diagnosi (6 – 12 mesi dalla prima visita) si raccomanda il trattamento con un inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE-inibitore). Tuttavia, il trattamento prolungato con ACE inibitore in cani asintomatici, a differenza della terapia con pimobendan, non ritarda l'insorgenza di insufficienza cardiaca congestizia indipendentemente dalla presenza di cardiomegalia (Kvart et al., 2002; Haggstrom et al., 2013).

L'intervento chirurgico in fase avanzata B2 è possibile nei pochi centri che effettuano la riparazione della valvola mitrale e che dimostrano tassi di complicanze accettabilmente bassi e risultati efficaci e durevoli.

## → Classe C

L'*American College of Veterinary Internal Medicine* fornisce delle linee guida per il trattamento farmacologico sia per la gestione in ospedale (acuta) sia per la gestione domiciliare (cronica) dell'insufficienza cardiaca.

Per entrambi gli stadi C e D (pazienti con MMVD con insufficienza cardiaca sintomatica), la cura dell'insufficienza cardiaca in fase acuta è finalizzata alla regolazione dello stato emodinamico del paziente e al ripristino della corretta ossigenazione dei tessuti. Ciò si ottiene monitorando e ottimizzando il precarico, il postcarico, la frequenza cardiaca, la contrattilità e l'ossigenazione (per quanto possibile, nelle circostanze cliniche esistenti). Gli obiettivi finali della terapia includono il miglioramento della portata cardiaca, la diminuzione del rigurgito della valvola mitrale e la risoluzione dei segni clinici dovuti a una bassa portata cardiaca o a pressioni venose eccessivamente aumentate associate a congestione.

Gli obiettivi generali della gestione cronica (in contesti clinici in cui non è possibile un intervento chirurgico per riparare efficacemente la valvola mitrale) includono il mantenimento dei miglioramenti emodinamici, il rallentamento della progressione della malattia, il prolungamento della sopravvivenza, la diminuzione dei segni clinici di CHF, il miglioramento della capacità di esercizio, il mantenimento del peso corporeo e il miglioramento della qualità della vita.

Le raccomandazioni ACVIM per il trattamento acuto (ospedaliero) dei cani in classe C includono:

- Furosemide al dosaggio di 2 mg/kg somministrata EV (o IM), seguita da 2 mg/kg EV o IM ogni ora fino a quando i segni respiratori del paziente non sono sostanzialmente migliorati (cioè, velocità e sforzo respiratori sono diminuiti) oppure fino a quando non è stato raggiunto un dosaggio totale di 8 mg/kg in 4 ore.
- Pimobendan, al dosaggio di 0,25 - 0,3 mg/kg somministrato PO q12h.
- Supplementazione di ossigeno, se necessaria, tramite un'apposita gabbia a temperatura e umidità controllata o tramite una cannula nasale
- Trattamenti meccanici (es. paracentesi addominale, toracocentesi) per alleviare versamenti sufficienti a compromettere la ventilazione o a causare distress respiratorio.
- Trattamento dell'ansia associata alla dispnea con narcotici, o con un narcotico combinato con un agente ansiolitico. È necessario monitorare la pressione sanguigna e la risposta respiratoria a narcotici e tranquillanti nel contesto di insufficienza cardiaca acuta.

- Dobutamina (2,5 - 10 µg/kg/min in infusione continua aumentando il dosaggio in modo incrementale) per migliorare la funzione ventricolare sinistra in pazienti che non rispondono adeguatamente a diuretici, pimobendan, sedazione, ossigeno e misure di *comfort care*. È raccomandabile il ricorso a monitoraggio elettrocardiografico continuo durante la somministrazione del farmaco con riduzione del dosaggio se si verificano tachicardia o battiti ectopici ventricolari.
- ACE-inibitori (enalapril o benazepril) al dosaggio di 0,5 mg/kg PO q12h.

Sebbene il trattamento con ACEI sia solitamente indicato per le fasi croniche, vi è, tuttavia, una chiara evidenza che la somministrazione acuta di enalapril in associazione con la furosemide in corso di insufficienza cardiaca acuta determina un miglioramento significativo della pressione polmonare rispetto alla somministrazione del solo diuretico d'ansa.

Le raccomandazioni ACVIM per il trattamento cronico (domiciliare) dei cani in classe C includono:

- Proseguimento della somministrazione di furosemide PO alla dose di 1 – 4 mg/kg ogni 12 h. In alternativa, si può sostituire la furosemide con la torasemide a 1/10 - 1/20 del dosaggio di furosemide.

Se si rendono necessari dosaggi cronici di furosemide maggiori o uguali a 8 mg/kg al giorno a fronte di dosaggi appropriati di pimobendan, ACE-inibitore e spironolattone significa che la patologia si è aggravata e il cane viene considerato refrattario alla terapia con conseguente passaggio allo stadio D ACVIM.

- ACE-inibitore (es. enalapril o benazepril) al dosaggio di 0,5 mg/kg PO q12h
- Spironolattone al dosaggio di 2 – 4 mg/kg PO q12-24 h

Questo farmaco può essere aggiunto alla terapia di base come coadiuvante per il trattamento cronico dell'insufficienza cardiaca. Il vantaggio principale dello spironolattone in questa situazione è l'antagonismo dell'aldosterone.

- Proseguimento della somministrazione di pimobendan, al dosaggio di 0,25 - 0,3 mg/kg PO q12h
- Diltiazem (spesso in combinazione con digossina) nei casi complicati da fibrillazione atriale per controllare la frequenza ventricolare

Oltre alla terapia farmacologica, nei casi cronici è necessario istituire un programma di cure estese strutturato e domiciliare per promuovere il monitoraggio da parte del proprietario di peso corporeo, appetito, respirazione e frequenza cardiaca. Di queste variabili, l'identificazione di aumenti della frequenza respiratoria a riposo al di sopra del normale ha il miglior valore predittivo per lo scompenso cardiaco imminente.

→ Classe D

I cani di classe D richiedono una dose giornaliera totale di furosemide di oltre 8 mg/kg (o un equivalente dosaggio di torasemide), somministrata in concomitanza con dosi standard degli altri farmaci pensati per controllare i segni clinici di insufficienza cardiaca (pimobendan a 0,25 - 0,3 mg/kg PO q12h; ACE-inibitore ad un dosaggio standard, spironolattone a 2 mg/kg al giorno).

Se diventano necessari farmaci antiaritmici per mantenere il ritmo sinusale o per regolare la risposta ventricolare alla fibrillazione atriale il paziente viene ugualmente considerato refrattario al trattamento standard.

Le raccomandazioni ACVIM per il trattamento acuto (ospedaliero) dei cani in classe D includono:

- Bolo EV iniziale di 2 mg/kg di furosemide seguito da dosi aggiuntive ripetute oppure infusione continua di furosemide alla dose di 0,66 - 1 mg/kg/h, fino a quando il distress respiratorio (frequenza e sforzo) non è diminuito o, in alternativa, per un massimo di 4 ore

Il diuretico d'ansa si usa in assenza di insufficienza renale grave, viene somministrato ai pazienti dispnoici con diagnosi di insufficienza cardiaca refrattaria.

- Torasemide al dosaggio di 0,1 - 0,2 mg/kg q12h - q24h

Può essere usata per trattare cani non più adeguatamente sensibili alla furosemide. La diuresi indotta dalla torasemide produce una minore attivazione del RAAS rispetto ai cani trattati con furosemide.

- Centesi cavitaria (paracentesi addominale, toracocentesi) per alleviare lo stress o la difficoltà respiratoria
- Idralazina (0,5 - 2,0 mg/kg PO) o amlodipina (circa 0,05 - 0,1 mg/kg PO).

Nei pazienti che possono tollerarlo, si raccomanda una vigorosa riduzione del postcarico attraverso il ricorso a vasodilatatori arteriosi da associare ad ACE-inibitori e a pimobendan. In questo caso è assolutamente necessario un attento monitoraggio della pressione arteriosa possibilmente tramite cateterismo arterioso periferico.

- Sildenafil (a partire da 1 - 2 mg/kg PO q8h) in caso di CHF complicata da ipertensione polmonare clinicamente rilevante.

L'ipertensione polmonare è riconosciuta come una complicanza sempre più frequente di MMVD, sia come conseguenza diretta di un grave rigurgito della valvola mitrale sia come comorbidità indipendente che può essere responsabile di segni clinici come la sincope, tosse e dispnea.

Nei cani che arrivano in emergenza con segni di distress respiratorio, oltre alla supplementazione di ossigeno, si può ricorrere all'assistenza ventilatoria meccanica per migliorare il comfort del paziente, per dare tempo ai farmaci di avere un effetto e per permettere ai meccanismi di adattamento atriale di instaurarsi, soprattutto in caso di esacerbazione acuta di MMVD e insufficienza respiratoria imminente (es. rottura delle corde tendinee con edema polmonare cardiogeno grave).

Le raccomandazioni ACVIM per il trattamento cronico (domiciliare) dei cani in classe D includono:

- Aumento secondo necessità del dosaggio di furosemide (o torasemide) per diminuire l'edema polmonare o eventuali versamenti nelle cavità corporee.

Un possibile limite all'uso di diuretici è rappresentato da una concomitante disfunzione renale (i cui indicatori devono essere generalmente monitorati 12-48 ore dopo l'aumento del dosaggio).

- Utilizzo della torasemide per trattare cani non più adeguatamente sensibili alla furosemide (il dosaggio iniziale di torasemide è di 0,1 - 0,2 mg/kg PO q12h, in alternativa si ricorre ad una quantità che equivalga a circa il 5% - 10% del precedente dosaggio di furosemide, fino a circa 0,6 mg/kg q12h)
- Aggiunta dello spironolattone alla terapia standard (se non già iniziato come raccomandato per lo stadio C)
- Idroclorotiazide come trattamento aggiuntivo alla furosemide o alla torasemide, utilizzando vari schemi di dosaggio (compreso l'uso intermittente ogni 2 - 4 giorni).

- Aumento del dosaggio di pimobendan o inclusione di una terza dose giornaliera di 0,3 mg/kg.
- Amlodipina o idralazina per ridurre il postcarico fornendo un ulteriore beneficio emodinamico e diminuendo la frequenza della tosse.
- Digossina, agli stessi dosaggi indicati per lo stadio C, per il trattamento della fibrillazione atriale e per tutti i pazienti in stadio D, compresi quelli in ritmo sinusale, privi di una controindicazione concreta. I beta-bloccanti possono essere utili per ridurre il tasso di risposta ventricolare in corso di fibrillazione atriale dopo la stabilizzazione e la digitalizzazione, ma si devono usare con cautela a causa degli effetti inotropi negativi.
- Sildenafil (1 - 2 mg / kg PO q8h) per la gestione dei pazienti quando vi è evidenza ecocardiografica di ipertensione polmonare da moderata a grave.
- Sedativi della tosse e broncodilatatori per il trattamento della tosse cronica e intrattabile (non compatibile con una qualità di vita dignitosa dell'animale e dei proprietari)

Il trattamento dietetico nei pazienti in stadio D segue tutte le considerazioni sottolineate per le classi precedenti. Inoltre, nei pazienti con accumuli refrattari di liquidi, si dovrebbe tentare di ridurre ulteriormente l'assunzione di sodio con la dieta (se ciò può essere fatto senza compromettere l'appetito o la funzione renale).

## **2.8. COMPLICAZIONI IN CORSO DI MMVD**

### **2.8.1. Fibrillazione atriale**

La fibrillazione atriale (FA) è l'aritmia più comune nel cane.

Si tratta di una tachiaritmia sopraventricolare e si presenta come un disturbo del ritmo caratterizzato da un'attivazione atriale non coordinata con conseguente deterioramento della funzione meccanica atriale (Jung et al., 2016).

La fibrillazione atriale è caratterizzata da intervalli RR irregolarmente irregolari e dall'assenza di onde P identificabili all'elettrocardiogramma. La frequenza irregolare delle contrazioni ventricolari è dovuta ad un'attività elettrica degli atri disorganizzata, rapida e caotica che non porta a un'effettiva contrazione atriale. Questo può esitare in una ridotta portata cardiaca con conseguente sviluppo di segni clinici quali intolleranza all'esercizio, svenimenti e insufficienza cardiaca congestizia (Fousse et al., 2019).



**Figura 12.** Tracciato elettrocardiografico di un cane con fibrillazione atriale, derivazione II. Il tracciato è caratterizzato da complessi QRS stretti, intervalli R-R di durata variabile e assenza di onde P. Velocità di registrazione 25 mm/s; 1 cm = 1 mV (adattato da Saunders et al., 2009)

Sebbene alcuni cani possano sviluppare la fibrillazione atriale in assenza di una patologia cardiaca riconoscibile (*lone atrial fibrillation*), più frequentemente questa aritmia insorge secondariamente a malattie cardiache associate all'ingrandimento atriale sinistro. I cani affetti da FA, ma senza malattia cardiaca sottostante hanno una prognosi migliore rispetto a quelli con malattia cardiaca, indipendentemente dal fatto che la condizione sia associata o meno a insufficienza cardiaca congestizia (Baron Toaldo et al., 2020).

L'insufficienza cardiaca e la FA sono collegate da fattori di rischio simili e condividono una fisiopatologia comune. Pertanto, possono esacerbarsi a vicenda attraverso meccanismi come il rimodellamento cardiaco strutturale, l'attivazione di meccanismi neuro-ormonali e la compromissione correlata alla frequenza di contrazione del ventricolo sinistro (Guglielmini et al., 2020).

La velocità di contrazione ventricolare in risposta all'aritmia è un fattore chiave che influenza la presentazione clinica e la prognosi nei cani con FA, infatti, gli animali con un importante aumento della frequenza cardiaca vanno più spesso incontro ad una prognosi infausta (Baron Toaldo et al., 2020).

L'assenza della fase di contrazione atriale e la riduzione del tempo di riempimento diastolico possono ridurre la gittata cardiaca e aumentare la pressione di riempimento atriale, entrambi i fattori possono contribuire al peggioramento della condizione di CHF e alla diminuzione della qualità e della quantità di vita (Jung et al., 2016).

Per questi motivi, è spesso necessario un controllo appropriato della frequenza cardiaca media utilizzando bloccanti nodali, come la digossina e il diltiazem. La diagnosi precoce di FA nei cani con malattie cardiache è estremamente importante per iniziare rapidamente un trattamento efficace e per migliorare la sopravvivenza.

I cani con dilatazione atriale sinistra e peso corporeo elevato sono a maggior rischio di sviluppare FA, infatti, questa aritmia viene rilevata più frequentemente nei cani di taglia grande con cardiomiopatia dilatativa. Altre circostanze in cui si può riscontrare FA associata a malattia cardiaca sono MMVD o patologie cardiache congenite associate ad ingrandimento atriale. La patologia atriale e l'aumento delle dimensioni atriali predispongono allo sviluppo di FA, poiché l'ingrandimento atriale è associato ad una maggiore dispersione della refrattarietà e ad un'alterata propagazione elettrica.

La fibrillazione atriale ha un'alta prevalenza nei cani con CHF dovuta a MMVD; i cani di taglia medio-grande con MMVD e CHF che sviluppano anche FA presentano un tempo di sopravvivenza inferiore rispetto agli animali senza aritmia. Inoltre, in cani di taglia grande con malattia mixomatosa della valvola mitrale, FA rappresenta un fattore di rischio indipendente per la morte cardiaca (Jung et al., 2016).

In un recente studio su FA in cani con MMVD si è osservato che gli animali che avevano sviluppato l'aritmia presentavano molte differenze nelle variabili cliniche ed ecocardiografiche rispetto ai cani senza FA. In particolare, FA era più diffusa nei cani maschi, meticci e con un peso corporeo più elevato. Inoltre, per quanto riguarda le variabili ecocardiografiche, i cani con FA presentavano un aumento significativo delle dimensioni atriali e ventricolari sinistre e una velocità dell'onda E particolarmente elevata (indice di aumento della pressione atriale sinistra).

Al termine dello studio, è stato rilevato che alcune variabili erano significativamente associate al rischio di sviluppare FA in cani affetti da malattia da degenerazione mixomatosa della valvola mitralica: aumento del peso corporeo, del rapporto LA/Ao e

della velocità dell'onda E; diminuzione di FS e concomitante presenza di scompenso cardiaco.

Questi risultati suggeriscono dunque che il rimodellamento atriale sinistro caratterizzato sia da aumento delle sue dimensioni che da un innalzamento della pressione costituisca un importante fattore di rischio per lo sviluppo di FA in cani con MMVD.

In conclusione, per quanto riguarda gli aspetti epidemiologici, lo studio attesta che FA è raramente associata a MMVD (Guglielmini et al., 2020).

### **2.8.2. Ipertensione polmonare**

In medicina veterinaria, l'ipertensione polmonare (*pulmonary hypertension*, PH) è stata descritta come una condizione emodinamica caratterizzata da un valore di pressione sistolica arteriosa polmonare stimato ecocardiograficamente mediante tecnica Doppler maggiore di 30 mmHg. L'ipertensione polmonare può essere ulteriormente distinta in ipertensione arteriosa polmonare (cioè precapillare, derivante da anomalie a carico del lato arterioso del sistema vascolare polmonare) e ipertensione venosa polmonare (cioè postcapillare, derivante da ipertensione venosa polmonare associata a cardiopatia del lato sinistro che porta a ipertensione capillare polmonare). (Kellihan e Stepien, 2012).

La pressione arteriosa polmonare è influenzata dal flusso sanguigno polmonare, dalla resistenza vascolare polmonare e dalla pressione venosa polmonare.

Per definizione, la PH pre-capillare si verifica come risultato di un aumento della resistenza vascolare polmonare a fronte di una normale pressione atriale sinistra. Le malattie che provocano PH precapillare includono PH idiopatica, filariosi cardiopolmonare, shunt congeniti sistemico-polmonari (cioè difetto del setto interatriale, difetto del setto interventricolare e dotto arterioso pervio) e vasculite/arterite necrotizzante.

Al contrario, PH post-capillare è il risultato di un aumento della pressione arteriosa polmonare con un pattern di resistenze polmonari normali. Il fenomeno di PH post-capillare si verifica più comunemente nei cani con malattia della valvola mitrale (MMVD) e malattia miocardica (es. cardiomiopatia dilatativa).

Il cateterismo del cuore destro è considerato il *reference standard* per la diagnosi di PH, tuttavia raramente in medicina veterinaria si ricorre a una tecnica così invasiva. Per questo motivo, l'ecocardiografia è considerata il metodo di scelta per la diagnosi di PH. Esistono molteplici modalità di *imaging* ecocardiografico che possono contribuire a una diagnosi di PH, tra cui *imaging* bidimensionale, M-mode, Doppler spettrale, Doppler a colori e Doppler tissutale (Borgarelli et al., 2015).

La valutazione ecocardiografica di PH si basa soprattutto sui cambiamenti caratteristici a cui va incontro il cuore a causa dell'ipertensione e sulla pressione arteriosa polmonare stimata attraverso l'analisi dei tracciati Doppler.

Una volta esclusa la presenza di ostruzione del tratto di efflusso del ventricolo destro (es. stenosi della valvola polmonare), la stima della pressione arteriosa polmonare (*pulmonary arterial pressure*, PAP) sistolica implica la quantificazione della velocità di picco del rigurgito della tricuspide (*tricuspid regurgitation velocity*, TRV) dalla quale si deriva il gradiente di pressione (*pressure gradient*, PG) tra ventricolo destro e atrio destro utilizzando l'equazione di Bernoulli semplificata:

$$PG = 4 \times TRV_{max}^2$$

Il gradiente pressorio atrioventricolare destro viene misurato in mmHg, TRV corrisponde alla massima velocità del rigurgito tricuspide e viene misurata in m/s. Quest'ultima viene registrata utilizzando la proiezione che fornisce l'allineamento migliore del fascio di interrogazione con il getto rigurgitante, in genere la proiezione parasternale sinistra a quattro camere ottimizzata per il tratto di efflusso del ventricolo destro (Kellihan e Stepien, 2012).

Per ottenere una stima accurata della PAP sistolica partendo dalla misurazione di TRV, al PG calcolato si dovrebbe aggiungere una stima della pressione dell'atrio destro. Tuttavia, ad oggi, i metodi convalidati in medicina umana per stimare la pressione dell'atrio destro non sono disponibili per il cane e quindi le stime della pressione atriale destra sono arbitrarie e potenzialmente errate. Per questo motivo, le linee guida per la diagnosi di ipertensione polmonare suggeriscono di usare solo la misurazione Doppler a onda continua del TRV per determinare la presenza di PH (Reinero et al., 2020).

Tuttavia, il valore di TRV dipende da molti fattori, tra cui la funzione del ventricolo destro, l'eventuale costrizione pericardica e la resistenza vascolare polmonare. Inoltre, la scarsa collaborazione del paziente e la respirazione affannosa influiscono sulle

misurazioni. Per questo, l'interpretazione accurata di un segnale TRV deve includere la considerazione di tutti i fattori che influenzano la pressione sistolica del ventricolo destro.

Oltre alla velocità tricuspide, diversi segni ecocardiografici aiutano a quantificare la probabilità di PH. Questi segni coinvolgono tre siti anatomici: ventricoli, arteria polmonare e atrio destro con vena cava caudale. I segni ecocardiografici rilevanti in corso di PH includono aumento della dimensione e rimodellamento del ventricolo sinistro e del ventricolo destro, appiattimento sistolico del setto interventricolare, disfunzione sistolica del ventricolo destro, aumento della dimensione dell'arteria polmonare, alterazione del profilo di flusso in arteria polmonare, aumento delle dimensioni di atrio destro e vena cava caudale.

La probabilità di avere ipertensione polmonare (vedi **Tabella 1**) si basa sul valore di TRV e sul numero di siti anatomici che presentano segni indicativi di rimodellamento dovuto a PH (1: ventricoli, 2: arteria polmonare, 3: atrio destro e vena cava caudale) (Reinero et al., 2020).

| <b>TRV (m/s)</b>       | <b>Numero di siti anatomici con segni di rimodellamento dovuto a PH</b> | <b>Probabilità di PH</b> |
|------------------------|---|--------------------------|
| ≤ 3 o non misurabile   | 0 o 1   | Bassa                    |
| ≤ 3 o non misurabile   | 2   | Intermedia               |
| Da 3,0 a 3,4           | 0 o 1   | Intermedia               |
| > 3,4                  | 0   | Intermedia               |
| ≤ 3,0 o non misurabile | 3   | Elevata                  |
| Da 3,0 a 3,4           | 2 o più   | Elevata                  |
| > 3,4                  | 1 o più   | Elevata                  |

*Tabella 1. Probabilità di PH sulla base di criteri ecocardiografici (Reinero et al., 2020).*

L'equazione di Bernoulli semplificata può essere applicata anche alle misurazioni Doppler spettrali della velocità diastolica del rigurgito polmonare (*pulmonary regurgitation*, PR) per ottenere una stima della PAP media.

L'ipertensione polmonare post capillare è una complicanza comune nei cani affetti MMVD. L'ipertensione causata da insufficienza cardiaca sinistra, inizialmente, è la conseguenza della trasmissione passiva retrograda dell'aumentata pressione di

riempimento ventricolare sinistra ai capillari polmonari. Questa fase è generalmente considerata reversibile. Tuttavia, se la pressione venosa polmonare rimane aumentata o continua ad aumentare, potrebbero verificarsi vasocostrizione dell'arteria polmonare e conseguente rimodellamento di arteria e vena polmonari ed in questo caso PH può diventare irreversibile (Borgarelli et al., 2015).

L'evidenza ecocardiografica di PH è comune nei cani in stadio B2 o C ed è associata ad una prognosi peggiore. Gli animali in stadio C presentano una prevalenza significativamente maggiore di PH rispetto ai cani in stadio B2. I soggetti con rigurgito mitralico più grave, quindi con una pressione atriale sinistra più elevata, presentano un rischio maggiore di sviluppare PH.

Se la pressione venosa polmonare rimane superiore al limite fisiologico o continua ad aumentare negli animali con scompenso cardiaco sinistro, il rilascio locale e sistemico di angiotensina II, del fattore di necrosi tumorale, di endotelina-1 e la vasodilatazione polmonare mediata dall'ossido nitrico conducono al rimodellamento dell'arteria e della vena polmonare e il processo diventa irreversibile. Nei cani con MMVD, un gradiente pressorio, calcolato a partire dalla velocità di rigurgito tricuspide, pari o superiore a 48 mmHg suggerisce la presenza di PH irreversibile (Chiavegato et al., 2009).

La presenza di malattie respiratorie croniche concomitanti, come collasso tracheale, bronchite cronica o malattia polmonare interstiziale, è comune nei cani di piccola taglia con MMVD. Queste malattie potrebbero contribuire allo sviluppo di PH.

La terapia farmacologica per l'ipertensione correlata a MMVD è finalizzata a diminuire la pressione arteriosa polmonare abbassando la pressione atriale sinistra, migliorando la funzione sistolica e diastolica del ventricolo sinistro e favorendo direttamente la vasodilatazione dell'arteria polmonare. Il trattamento delle pressioni atriali sinistre elevate e della disfunzione del ventricolo sinistro implica tipicamente l'uso di diuretici (ad esempio furosemide o torasemide), di vasodilatatori bilanciati (ad esempio ACE inibitori o pimobendan), di bloccanti neuroormonali (ad esempio ACE inibitori, antagonisti dell'aldosterone) e di inotropi positivi (ad esempio pimobendan).

Gli inibitori della fosfodiesterasi terza sensibilizzanti al calcio (pimobendan) e gli inibitori della fosfodiesterasi quinta (sildenafil) rappresentano i vasodilatatori polmonari più utilizzati nei cani (Reinero et al., 2020).

### 2.8.3. Rottura dell'atrio sinistro

La rottura o fessurazione dell'atrio sinistro rappresenta una complicazione grave, ma raramente riscontrata nei cani affetti da MMVD.

Questo evento è provocato da una serie di cause, tra cui l'ingrandimento atriale sinistro e l'impatto ad alta velocità del getto rigurgitante sulla parete atriale. I getti rigurgitanti sono generalmente diretti obliquamente, orientati verso la parete atriale sinistra posteriore-dorsale o posteriore-laterale. Tali getti possono traumatizzare l'endocardio atriale e provocare lesioni endocardiche focali da contatto, ispessite e fibrotiche (*jet impact lesions*).

Le alterazioni istopatologiche del tessuto danneggiato includono degenerazione endomiocardica, fibrosi e necrosi con emorragia, deposito di fibrina e infiammazione acuta o cronica.

La combinazione tra lesioni focali e rimodellamento cardiaco determina lo sviluppo di fessurazioni multiple dell'endocardio e/o dell'endomiocardio dell'atrio sinistro che possono essere riparate o possono portare alla perforazione della parete atriale con sviluppo di versamento pericardico o di difetti acquisiti del setto interatriale (Fox, 2012).

L'emopericardio conseguente a rottura dell'atrio sinistro rappresenta una condizione clinica grave e il trattamento richiede un'attenta valutazione del paziente. Se è presente tamponamento cardiaco, è necessario ricorrere a una pericardiocentesi associata o meno a una terapia con fluidi al fine di mantenere una portata cardiaca sufficiente. La prognosi è in genere riservata; tuttavia, i cani che sopravvivono nel periodo immediatamente successivo alla rottura hanno una prognosi favorevole sul lungo termine, inoltre gli animali che non sono mai andati incontro ad insufficienza cardiaca congestizia prima dell'episodio di rottura dell'atrio sinistro presentano una sopravvivenza maggiore rispetto agli animali con una storia clinica di CHF (Nakamura et al., 2014).

I difetti acquisiti del setto atriale secondari a rottura atriale non sono molto comuni nei cani con MMVD. I difetti acquisiti possono alterare la fisiologia, il piano di trattamento e le implicazioni prognostiche dei cani affetti. La presenza di un difetto del setto atriale deve essere considerata in tutti i casi di MMVD in cui compaiono segni di insufficienza cardiaca destra.

I difetti del setto vengono identificati mediante ecocardiografia e la proiezione migliore per fare una valutazione dell'integrità del setto interatriale è la proiezione parasternale destra in asse lungo 4 camere. La *fossa ovalis*, per le sue caratteristiche anatomiche, rappresenta un punto di minor resistenza nel setto interatriale e dunque la maggior parte dei casi di rottura acquisita si collocano in questo punto (Peddle e Buchanan, 2010).

In contrasto con la rottura della parete caudale che causa emopericardio, la rottura del setto atriale può offrire un percorso da una camera ad alta pressione (atrio sinistro) verso una a bassa pressione (atrio destro). Il passaggio da sinistra a destra del sangue provoca un sovraccarico di volume sul lato destro del cuore con possibile insorgenza di insufficienza cardiaca destra (Peddle e Buchanan, 2010).



### 3. RDW COME BIOMARKER DI MALATTIA

I globuli rossi (GR) o eritrociti sono le cellule del sangue più numerose (6–9 milioni per mm<sup>3</sup> nel cane; 4–6 milioni per mm<sup>3</sup> nell'uomo). La funzione principale di questi elementi nei vertebrati è il trasporto di ossigeno attraverso il sistema circolatorio dai polmoni ai tessuti periferici. Nei mammiferi, gli eritrociti non hanno un nucleo e sono caratterizzati da una forma a disco biconcavo con un appiattimento al centro.

Il volume degli eritrociti varia ampiamente tra le diverse specie di vertebrati. Nell'uomo, per esempio, i GR hanno un diametro che va da 6 a 8 µm e uno spessore di 2 µm. Nel cane, il diametro medio è 7 µm. Il volume fisiologico di un eritrocita è compreso tra 80 e 100 fL nell'uomo e tra 60 e 77 fL nel cane.

In particolari circostanze, i GR possono andare incontro a consistenti aumenti o diminuzioni del loro volume caratteristico. La plasticità della membrana plasmatica e il contenuto relativamente modesto di molecole intracellulari (principalmente emoglobina) permettono importanti contrazioni o espansioni della forma e del volume. Gli eritrociti possono diminuire il loro volume (microcitosi) o aumentarlo acquisendo una forma sferica (macrocitosi) senza andare incontro a significative perdite della continuità di membrana o a danni cellulari.

Il grado di eterogeneità del volume dei GR ovvero il grado di anisocitosi viene tradizionalmente quantificato con un'equazione nella quale la deviazione standard (*standard deviation*, SD) del volume di GR viene rapportata al volume medio corpuscolare (*mean corpuscular volume*, MCV) degli eritrociti e infine il risultato viene moltiplicato per cento per esprimere il dato in percentuale. Il risultato di questa equazione è noto come ampiezza di distribuzione eritrocitaria (*red blood cell distribution width*, RDW).

$$RDW = \frac{(SD \text{ volume GR})}{MCV} \times 100$$

I valori minimo e massimo comunemente utilizzati per definire il range fisiologico di RDW in medicina umana sono 12% e 15% rispettivamente (Henry J.B. et al., 2011). Il

range di riferimento risente fortemente dello strumento utilizzato per l'esame emocromocitometrico.

L'osservazione di valori di RDW al di sotto dei range di riferimento è poco frequente e clinicamente di scarso significato; al contrario, un aumento del valore al di sopra di una soglia specifica per ogni strumento di misurazione rispecchia una condizione di anisocitosi che può essere dovuta alla presenza di eritrociti più piccoli e/o più grandi del normale (Salvagno et al., 2015).

La misurazione di RDW è molto semplice e poco costosa, si ottiene parallelamente ad altri valori di uso comune durante un routinario esame emocromocitometrico.

Questo parametro è stato storicamente utilizzato per classificare l'anemia perché riflette il grado di variazione e di eterogeneità delle dimensioni degli eritrociti circolanti. Infatti, il valore aumenta parallelamente al grado di anisocitosi, per cui quando si riporta un elevato RDW all'esame emocromocitometrico, si prevede anche una marcata anisocitosi dopo la lettura dello striscio di sangue periferico (Lippi e Plebani, 2014).

Nell'uomo, le forme di anemia possono essere classificate anche in base al valore di MCV: microcitica (diminuzione di MCV), normocitica (MCV normale) o macrocitica (aumento di MCV). La combinazione di MCV e RDW permette un'ulteriore sotto classificazione: le anemie causate da deficit nutrizionali (ferro, folati o vitamina B12), da patologie autoimmuni, da insufficienza epatica o le anemie emolitica e falciforme sono associate ad un grado più elevato di anisocitosi rispetto a quelle causate da difetti genetici o da disordini primari del midollo osseo (Lippi e Plebani, 2014).

Anche se questa classificazione è utile per distinguere i tipi di anemie e le rispettive cause, possono comunque esserci delle sovrapposizioni tra le diverse condizioni.

| Valore di RDW | MCV diminuito   | MCV normale  | MCV aumentato  |
|---------------|---|--|--|
| Normale       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anemia da patologia cronica</li> <li>- Talassemia eterozigote</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anemia da patologia cronica</li> <li>- Perdita acuta di sangue o emolisi</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anemia aplastica</li> <li>- Patologia epatica cronica</li> <li>- Chemioterapia/ antivirali/ alcool</li> </ul> |

|           |  |   |  |
|-----------|--|---|--|
|           | - Emoglobina E (HbE)   | - Anemia da patologia renale  |  |
| Aumentato | - Carenza di ferro<br>- Anemia emolitica<br>- HbS/beta talassemia<br>- Anemia emolitica microangiopatica | - Precoce carenza di ferro<br>- Precoce carenza di folati o di vitamina B12<br>- Trasfusioni<br>- Patologia cronica epatobiliare<br>- Anemia falciforme | - Anemia emolitica autoimmune<br>- Carenza di vitamina B12 o di folati<br>- Sferocitosi ereditaria |

*Tabella 2. Classificazione in medicina umana delle anemie in base al volume corpuscolare medio (MCV) e all'ampiezza di distribuzione eritrocitaria (RDW) (da Salvagno et al., 2015)*

Il valore di RDW può essere anche utilizzato per verificare se il midollo risponde in modo adeguato a fronte di un'anemia; l'indice di anisocitosi, dunque, serve come una prima possibile discriminazione tra anemia rigenerativa e non rigenerativa (Neiger et al., 2002).

RDW può variare anche in un discreto numero di condizioni fisiologiche. L'ormone eritropoietina regola la produzione di eritrociti nel midollo osseo, la loro maturazione e la loro sopravvivenza costituendo quindi uno dei maggiori determinanti di RDW. Sia una riduzione che un aumento nella produzione di eritropoietina possono condurre ad un aumento graduale del livello di anisocitosi. Inoltre, attualmente, i dati disponibili desunti da studi effettuati in medicina umana suggeriscono che l'invecchiamento, l'esercizio fisico e la gravidanza siano determinanti per un innalzamento dei valori di RDW (Salvagno et al., 2015).

### **3.1.RDW IN MEDICINA UMANA**

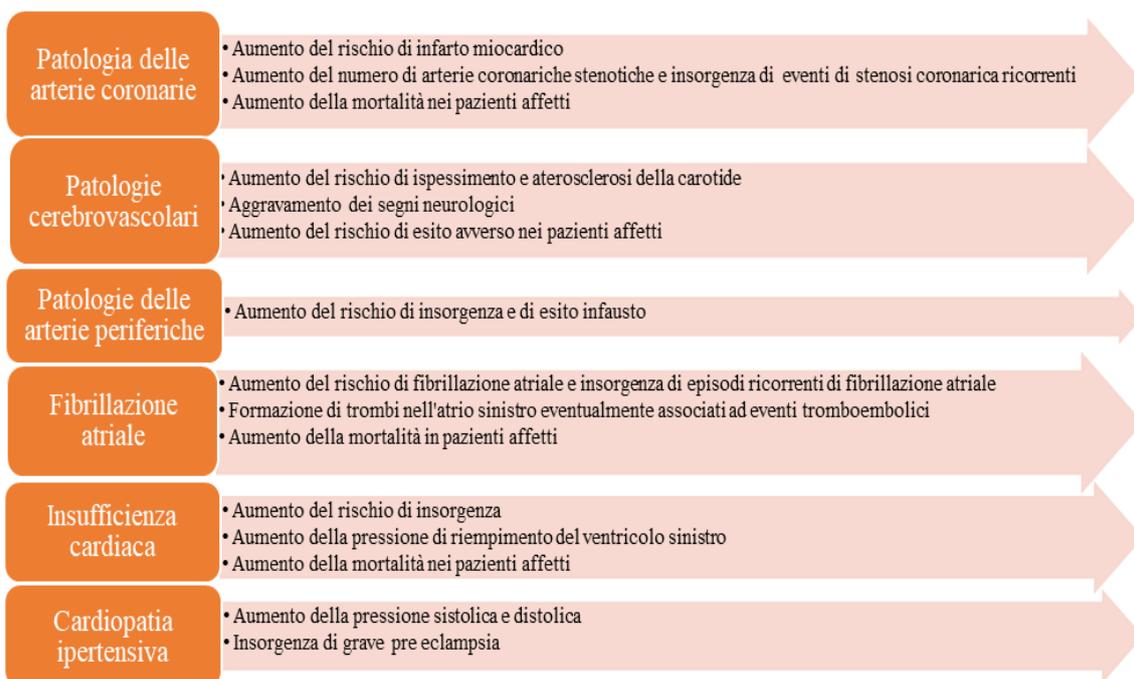
Recentemente, RDW ha trovato alcune nuove applicazioni interessanti nella patologia clinica umana. Attualmente è in corso la ricerca di biomarcatori semplici e poco

costosi che possano fornire informazioni clinicamente utili sul rischio di mortalità e morbilità per diverse patologie: RDW è una semplice equazione generata automaticamente da tutti gli emocitometri di routine e non richiede costi aggiuntivi, attività specifiche o interpretazione complessa.

Diversi studi clinici in medicina umana hanno mostrato che un aumento di RDW non è associato solo a disordini ematologici come le anemie, ma si correla anche con altre patologie come pancreatite acuta, insufficienza renale cronica, disordini gastrointestinali, cancro e malattie cardiovascolari (*cardiovascular diseases, CVD*).

Gli studi si sono focalizzati prevalentemente sulle malattie cardiovascolari poiché queste costituiscono una causa importante di mortalità e hanno un grosso impatto sulla salute della popolazione. Un'accurata stratificazione del rischio per i pazienti con insufficienza cardiaca cronica è di fondamentale importanza per indirizzare in modo efficiente l'uso di terapie e per identificare i pazienti ad alto rischio che possono trarre beneficio da trattamenti preventivi. Oltre a migliorare la stratificazione del rischio, l'identificazione di nuovi marcatori prognostici può fornire informazioni sulla fisiopatologia sottostante o suggerire strade per lo sviluppo di nuove terapie (Felker et al., 2007).

Nella review di Parizadeh e colleghi, pubblicata nel 2019, sono stati raccolti i risultati dei diversi studi effettuati negli anni passati per investigare l'associazione tra il livello di RDW e le complicazioni cardiovascolari (malattie coronariche, infarto, patologie delle arterie periferiche, insufficienza cardiaca, fibrillazione atriale, ipertensione, tromboembolismo venoso...), come riassunto in **Figura 13**. In generale, un aumento di RDW è associato a un peggioramento clinico e a una prognosi meno favorevole per il paziente.



**Figura 13.** Effetto dell'aumento di RDW in diverse patologie cardiovascolari (adattato da Parizadeh et al., 2019)

Di recente, è stato particolarmente approfondito il ruolo di RDW in pazienti con insufficienza cardiaca. Svareti studi dimostrano che alti livelli di RDW sono associati a una maggiore incidenza di insufficienza cardiaca e ad una peggiore prognosi nei pazienti affetti.

Per esempio, nello studio di Felker e colleghi pubblicato nel 2007 è stato riportato che in una popolazione affetta da insufficienza cardiaca cronica, RDW costituisce un forte fattore predittivo indipendente per morbilità e mortalità. Nell'analisi multivariata, l'aumento di RDW è risultato tra i fattori predittivi complessivi più significativi, mostrando un'associazione più forte con l'*outcome* della patologia rispetto a molte misure di rischio tradizionali come la classe funzionale NYHA e la frazione di eiezione.

Lo studio di Al-Najjar et al. del 2009 ha ulteriormente validato gli esiti del precedente dimostrando che RDW è un parametro indipendente da NT-proBNP come marker prognostico in pazienti con insufficienza cardiaca; inoltre, nella maggior parte dei casi analizzati i due marker laboratoristici presentavano un ruolo prognostico simile.

Recentemente, oltre agli aspetti epidemiologici, sono state indagate più approfonditamente anche la fisiopatologia dell'insorgenza di anisocitosi in diversi quadri

clinici e le ulteriori alterazioni dell'omeostasi che accompagnano questo fenomeno. Per esempio, lo studio di Allen e colleghi del 2010 ha evidenziato il ruolo di RDW come un potente marker prognostico in corso di insufficienza cardiaca cronica, ma si è visto anche che un valore di RDW elevato può essere associato a parametri biochimici indicativi di uno stato di infiammazione e di una ridotta mobilizzazione del ferro: ciò suggerisce che un'alterazione di RDW possa costituire una misura integrativa di diversi processi fisiopatologici potenzialmente importanti nell'insufficienza cardiaca, come stress infiammatorio e alterato metabolismo del ferro.

Per quanto riguarda le patologie non cardiovascolari, il valore medio di RDW è significativamente aumentato in pazienti con cancro coloretale, diabete, patologia renale, patologia epatica, polmonite cronica ostruttiva e altre patologie descritte in medicina umana, come indicato nella **Tabella 3**. Inoltre, è descritta un'associazione tra RDW e la mortalità per qualsiasi causa (Salvagno et al., 2015).

|  |  |
|--|--|
| Disordini cardiovascolari e trombotici | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Patologie cardiovascolari</li> <li>- Ectasia delle arterie coronarie</li> <li>- Insufficienza cardiaca</li> <li>- Patologia occlusiva delle arterie periferiche</li> <li>- Ischemia acuta mesenterica</li> <li>- Trombosi venosa</li> </ul> |
| Disordini metabolici                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diabete</li> <li>- Patologia renale</li> <li>- Patologia epatica</li> <li>- Ipotiroidismo subclinico</li> </ul>   |
| Condizioni acute                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avvelenamento acuto</li> <li>- Pancreatite acuta</li> <li>- Pre eclampsia</li> <li>- Pazienti critici</li> <li>- Trauma</li> <li>- Frattura dell'anca</li> </ul>  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| Condizioni croniche | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cancro</li> <li>- Malattia infiammatoria cronica intestinale</li> <li>- Polmonite ostruttiva cronica</li> <li>- Polmonite acquisita in comunità</li> <li>- Eemicrania</li> </ul> |
|---------------------|---|

*Tabella 3. Patologie sistemiche descritte in medicina umana in cui RDW presenta un'utilità clinica (adattato da Salvagno et al., 2015)*

Per spiegare il collegamento tra RDW e le condizioni cliniche precedentemente elencate sono stati ipotizzati diversi meccanismi fisiopatologici che includono accorciamento della lunghezza dei telomeri, stress ossidativo, infiammazione, stato nutrizionale inadeguato, dislipidemia, ipertensione, frammentazione degli eritrociti e alterazione della funzione dell'eritropoietina. Le possibili cause di incremento del livello di anisocitosi sono state riassunte nella **Tabella 4**.

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Aspetti generali          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Accorciamento della lunghezza dei telomeri</li> <li>- Stress ossidativo</li> <li>- Infiammazione</li> </ul>  |
| Patologie cardiovascolari | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dislipidemia</li> <li>- Ipertensione</li> </ul>  |
| Tromboembolismo venoso    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Scarso stato nutrizionale</li> </ul>   |
| Cancro                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Scarso stato nutrizionale</li> <li>- Frammentazione eritrocitaria</li> </ul>   |
| Diabete                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Glicosilazione delle proteine di superficie</li> <li>- Frammentazione eritrocitaria</li> <li>- Dislipidemia</li> </ul>   |
| Patologia renale          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Declino della sintesi di eritropoietina e di iporesponsività dell'eritropoietina</li> <li>- Scarso stato nutrizionale</li> <li>- Frammentazione eritrocitaria</li> </ul> |

|                   |  |
|-------------------|--|
| Patologia epatica | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Iporesponsività dell'eritropoietina</li> <li>- Scarso stato nutrizionale</li> <li>- Frammentazione eritrocitaria</li> </ul> |
|-------------------|--|

*Tabella 4. Squilibri biologici e metabolici che possono contribuire all'aumento del livello di anisocitosi in patologie umane (adattato da Salvagno et al., 2015)*

Lo stress ossidativo è una condizione caratterizzata dalla compromissione dell'equilibrio tra agenti ossidanti e difese antiossidanti ed è associato a una maggiore generazione di specie reattive dell'ossigeno e conseguente danno agli acidi nucleici, alle proteine e ai lipidi. Questa condizione è comune nella maggior parte dei disturbi cronici umani. Lo stress ossidativo ha una profonda influenza sull'omeostasi e sulla sopravvivenza degli eritrociti. Di conseguenza, basse concentrazioni sieriche di antiossidanti sono state associate ad alti valori di RDW.

L'infiammazione, analogamente allo stress ossidativo, è comune nella maggior parte delle patologie umane ed è anche il principale meccanismo responsabile della presenza di anisocitosi nei pazienti con patologie cardiovascolari poiché diverse citochine pro-infiammatorie inibiscono la sintesi o l'attività dell'eritropoietina e conseguentemente quella dei globuli rossi (GR). Inoltre, uno stato infiammatorio riduce la sopravvivenza dei GR danneggiando le loro membrane e aumentando la loro fragilità a causa dello stress ossidativo, portando così a una popolazione di globuli rossi circolanti con volumi estremamente variabili che include anche cellule immature.

A sua volta, l'anisocitosi può influenzare direttamente diverse condizioni cliniche, inclusa l'insufficienza cardiaca. Un grado elevato di anisocitosi solitamente indica una diminuita capacità di trasportare l'ossigeno. Inoltre, i GR anormali possono partecipare allo sviluppo di fibrosi cardiaca amplificando l'infiammazione. Questi effetti esitano in una diminuita ossigenazione di diversi tessuti inclusi i cardiomiociti e predispongono il sistema cardiovascolare allo sviluppo di patologie, tra cui fenomeni ischemici e insufficienza d'organo (Parizadeh et al., 2019).

Esiste una relazione forte e diretta tra il grado di anisocitosi e il contenuto di colesterolo delle membrane degli eritrociti. Quest'ultimo è positivamente e indipendentemente associato all'instabilità clinica nei pazienti con disturbi cardiovascolari (Tziakas et al., 2012).

Un altro potenziale meccanismo a supporto del ruolo patogenetico dell'anisocitosi in corso di patologia cardiovascolare è correlato al fatto che un aumento di RDW è significativamente e positivamente associato a una ridotta deformabilità degli eritrociti. È quindi plausibile che una maggiore variazione dei volumi degli eritrociti aumenti la viscosità del sangue e contemporaneamente comprometta il flusso sanguigno attraverso il microcircolo (Patel et al., 2013).

In conclusione, un aumento di RDW rispecchia una profonda deregolamentazione dell'omeostasi degli eritrociti che coinvolge sia l'eritropoiesi alterata sia il metabolismo e la sopravvivenza degli eritrociti anormali. Ciò può essere causato da una varietà di anomalie che costituiscono importanti fattori prognostici per morbilità e mortalità. Quindi, RDW da solo o in combinazione con altri *biomarker* può migliorare la diagnosi e valutare la prognosi a breve e lungo termine di diverse patologie cardiovascolari e non.

Sono comunque necessarie ulteriori indagini per valutare efficacia e accuratezza di RDW nella pratica clinica. Ad oggi non è ancora stato stabilito con certezza se un aumento del valore di RDW sia un fattore di rischio o debba essere considerato solo un epifenomeno di uno squilibrio biologico e metabolico sottostante, tuttavia, sembra ragionevole suggerire che la valutazione di questo parametro debba essere ampliata ben oltre le diagnosi differenziali di anemie.

Indipendentemente dal disturbo di base, nei pazienti con valori di RDW aumentati andrebbero fatti ulteriori approfondimenti in modo da analizzare più accuratamente la patologia in atto e impostare tempestivamente un'eventuale terapia.

### **3.2.RDW IN MEDICINA VETERINARIA**

L'ampiezza di distribuzione dei globuli rossi in medicina veterinaria viene tipicamente utilizzata per discriminare tra anemia rigenerativa e non rigenerativa. L'anemia rigenerativa deriva dalla distruzione degli eritrociti (emolisi) o dalla perdita di sangue acuta (emorragia), mentre l'anemia non rigenerativa si osserva in corso di molti tipi di malattie croniche e infiammatorie, di neoplasia, di disturbi del midollo osseo e di carenza di ferro nella dieta. Quando lo stimolo ipossico è sufficientemente grave, in

pazienti anemici con midollo osseo funzionale si sviluppa reticolocitosi, mentre i pazienti con midollo osseo disfunzionale possono non rispondere adeguatamente all'anemia. La gravità dell'anemia è inversamente correlata al grado di reticolocitosi, mentre la gravità della macrocitosi (MCV) e dell'anisocitosi (RDW) sono direttamente correlate al grado di reticolocitosi.

Un valore di RDW elevato presenta una sensibilità diagnostica maggiore, ma una specificità inferiore rispetto a MCV per identificare l'anemia rigenerativa. La combinazione di RDW elevato con il rilevamento di policromasia (indice di reticolocitosi) presenta la massima accuratezza diagnostica (Hodges e Cristopher, 2011).

A seguito delle diverse pubblicazioni in medicina umana nelle quali è stato rilevato che il grado di anisocitosi è associato anche a processi patologici diversi dall'anemia, sono stati formulati alcuni studi per valutare se in medicina veterinaria ci fosse un'associazione tra il valore di RDW e l'incidenza, la gravità e la prognosi di diverse patologie.

Attualmente, le informazioni sul ruolo e sulla variabilità fisiologica di RDW nel cane sono limitate. La microcitosi si osserva fisiologicamente in alcune razze come lo Shiba giapponese, l'Akita e l'Hokkaido, mentre la macrocitosi si rileva nei Barboncini toy; entrambe le condizioni portano ad un innalzamento di RDW. È stato riportato un aumento della RDW anche nell'Alaskan malamute, nel Drentse Patrisjshond e nello Schnauzer nano con stomatocitosi sintomatica e asintomatica ereditaria (Martinez et al., 2019).

Una prima indagine pubblicata nel 2013 da Guglielmini e colleghi aveva come obiettivo la valutazione di RDW in cani affetti da MMVD con insufficienza cardiaca compensata o non compensata.

Al termine dello studio, i risultati principali indicavano che RDW non era significativamente diverso tra cani sani e cani con MMVD, allo stesso modo dei cani affetti da MMVD, con o senza insufficienza cardiaca. Inoltre, RDW era scarsamente correlato con gli indici ecocardiografici di ingrandimento del cuore sinistro e di alterata funzione cardiaca nei cani affetti; infatti, era stata trovata solo una debole correlazione positiva tra RDW e il rapporto atrio sinistro/aorta.

Secondo questo studio, l'assenza di un aumento di RDW nei cani affetti, con insufficienza cardiaca compensata o scompensata, probabilmente riflette le differenze di eziologia e fisiopatologia dell'insufficienza cardiaca tra uomo e cane. Infatti, in medicina umana, si sospetta che il rilascio di citochine infiammatorie in corso di insufficienza cardiaca e infarto miocardico acuto possa inibire la funzione del midollo osseo e la maturazione degli eritrociti indotta dall'eritropoietina (Felker et al., 2007; Tonelli et al., 2008). Nei cani con MMVD, l'infarto miocardico è raro e i biomarcatori circolanti come le citochine non giocano un ruolo centrale nella patogenesi della MMVD canina (Guglielmini et al., 2013).

Questi primi risultati suggerivano quindi che l'anisocitosi misurata da RDW non svolgesse un ruolo importante nella fisiopatologia della MMVD canina. Lo studio, tuttavia, non raccoglieva e indagava dati sull'esito finale della patologia nei cani arruolati, per questa ragione il valore prognostico di RDW nei cani con MMVD è stato e potrebbe essere in futuro oggetto di ulteriori indagini.

Altri approfondimenti hanno riguardato la correlazione tra RDW e PH pre-capillare o post-capillare (Swann et al., 2014; Mazzotta et al., 2016).

Il primo studio evidenziava una differenza significativa di RDW tra cani con PH precapillare e cani sani (gruppo controllo), ma non tra controlli e cani con PH post-capillare. Non era stata rilevata una differenza significativa nella sopravvivenza tra cani raggruppati in base ai valori di RDW. Infine, RDW non costituiva un fattore predittivo significativo della gravità dell'ipertensione polmonare. Come facilmente prevedibile, lo studio attestava una correlazione di RDW con MCV ed ematocrito e lo stesso tipo di risultato era stato riscontrato anche nello studio di Guglielmini e colleghi del 2013.

In contrasto con gli studi sui pazienti umani, nell'indagine di Swann, non è stata trovata alcuna correlazione significativa tra RDW e velocità di picco del rigurgito tricuspideale e polmonare. Tuttavia, questo aspetto potrebbe essere influenzato dalle differenze nella dimensione dei campioni tra questo studio sul cane e le indagini più estese su pazienti umani.

Le ragioni dell'alterazione di RDW nei pazienti con PH non sono chiaramente identificate nell'elaborato. Un possibile collegamento tra i due fenomeni è dato dal fatto che RDW è un indicatore di anisocitosi che varia con l'anemia da carenza di ferro e lo stato del ferro

sembra essere essenziale nella regolazione del tono vascolare polmonare. In pazienti umani con insufficienza cardiaca con PH post-capillare, si ritiene invece che il valore di RDW sia influenzato da infiammazione cronica, disfunzione renale, eritropoiesi alterata e stress ossidativo e nutrizionale (Forhecz et al., 2009).

A differenza degli esiti ottenuti in medicina umana, nell'indagine di Swann e colleghi del 2014, RDW non ha fornito informazioni prognostiche clinicamente utili. Questo risultato può essere dovuto alla ridotta dimensione del campione dei cani affetti o all'influenza di trattamenti con furosemide, sildenafil e pimobendan utilizzati dopo la diagnosi di PH.

Nel complesso, questo articolo è stato il primo a indicare che RDW può essere utile nella diagnosi di PH nel cane, ma allo stesso tempo non è stata rilevata nessuna correlazione statisticamente significativa né con la gravità della malattia né con la prognosi.

Il secondo studio su RDW e ipertensione polmonare (Mazzotta et al., 2016) ha confrontato 44 cani con PH e 79 controlli sani.

Nei cani sani, la mediana di RDW era 13,3% (12,3–13,7%), mentre nei cani con PH-MMVD e PH precapillare era rispettivamente del 13,7% (13,2-14,7%) e del 13,8% (13,2-14,9%). I valori riscontrati nei cani affetti da PH erano significativamente più alti rispetto a quelli dei cani controllo ( $P < 0,05$  per entrambi i confronti). Tuttavia, nessuna differenza significativa era stata trovata per RDW tra cani controllo e cani con MMVD, in linea con lo studio di Guglielmini e colleghi del 2013.

È stata poi eseguita una suddivisione degli animali in base alla gravità della patologia: la mediana di RDW nei cani con PH grave era del 14,5% (13,6-17,3%), significativamente più alta rispetto a quella dei cani senza PH ( $P < 0,05$ ). Allo stesso tempo, il valore di RDW di cani con PH lieve o moderata non era significativamente diverso da quello dei cani senza PH.

Infine, l'analisi multivariata ha mostrato che età, ematocrito, numero di leucociti e concentrazione sierica di urea erano significativamente associati con un aumento di RDW nel cane. In linea con lo studio di Swann e colleghi, il gradiente di pressione del rigurgito tricuspide (indice di gravità dell'ipertensione) non era significativamente associato al livello di anisocitosi.

Sia nel gruppo di cani con PH associata a MMVD o PH precapillare, sia nei gruppi di animali con PH moderata o grave è stato riscontrato un aumento della concentrazione dei leucociti.

L'associazione significativa della conta dei globuli bianchi con RDW suggerisce che l'infiammazione possa essere associata all'anisocitosi nei cani con PH. Tuttavia, l'aumento delle leucociti in questi cani potrebbe anche rappresentare una risposta dovuta allo stress per la malattia sottostante, per il ricovero in ospedale o per entrambe le condizioni.

I risultati dello studio suggeriscono dunque che RDW costituisca un marker di disturbi concomitanti nei cani con PH perché l'associazione tra RDW e gravità di PH non è stata confermata nelle analisi multivariate.

Nel complesso, a differenza dello studio di Swann e colleghi, è stato riscontrato un valore di RDW significativamente aumentato nei cani con PH sia precapillare che postcapillare, così come nei cani con PH grave, indipendentemente dal meccanismo fisiopatologico sottostante. Sebbene il meccanismo biologico alla base dell'associazione tra RDW elevato e PH non possa essere determinato da questo studio, i risultati portano ad ipotizzare un collegamento con una condizione di disidratazione, con uno stato pro-infiammatorio o stressante, o con entrambi.

Per quanto riguarda le malattie non cardiovascolari, è stato condotto uno studio per confrontare la presenza e la quantità di nRBC (*nucleated red blood cells*), la concentrazione di ferro nel siero/plasma e il valore di RDW tra cani sopravvissuti e non sopravvissuti ad incidenti con lesioni traumatiche acute (Fish et al., 2017).

L'ipotesi iniziale era che, analogamente alla medicina umana, presenza ed entità di eritrocitosi, bassi livelli sierici/plasmatici di ferro e aumento di RDW fossero associati a una mortalità più elevata all'interno della popolazione campione. Tuttavia, in questa indagine, RDW non ha mostrato capacità di discriminare gli esiti nella coorte di pazienti presi in considerazione né è stata rilevata alcuna associazione con la sopravvivenza. Al contrario, la presenza di nRBC e di bassi livelli sierici/plasmatici di ferro era positivamente correlata con un aumentato rischio di mortalità nei pazienti con trauma acuto.

Lo studio più recente sull'associazione tra RDW e stati patologici nel cane (Martinez et al., 2019) indaga il valore di RDW in gruppi di cani affetti da diverse patologie confrontati con un gruppo di cani sani. Valori di RDW significativamente più alti sono stati riscontrati nei cani con anemia emolitica primaria immuno-mediata ( $P =$

0,0001), trombocitopenia immuno-mediata (P = 0,0004), iperadrenocorticismo (P = 0,0001), ipotiroidismo (P = 0,0220), anomalia vascolare epatica (P = 0,0001), polmonite (P = 0,0001), patologia renale cronica (P = 0,0005), linfoma multicentrico (P = 0,0002) e MMVD (P = 0,0032).

A differenza delle corrispondenti malattie umane, lo studio non ha rilevato alcuna differenza significativa di RDW tra il gruppo di controllo e i cani con diagnosi di diabete mellito, meningiti di origine non nota, epilessia idiopatica, epatite, pancreatite e malattia cronica infiammatoria intestinale.

In contrasto con il primo studio citato, nel gruppo di cani affetti da MMVD, il valore mediano di RDW era significativamente più alto rispetto a quello dei cani sani. In 5 cani tra i 25 appartenenti a questo gruppo sono stati rilevati dei valori di RDW aumentati rispetto al range considerato fisiologico per lo studio (da 14,5% a 16,3%).

I meccanismi sottostanti proposti come causa del riscontro di valori anormali di RDW includono disturbi microvascolari, anemia, presenza di citochine infiammatorie, stress ossidativo, aumento della concentrazione di colesterolo libero, trombosi, carenze nutrizionali, disfunzione renale concomitante e attivazione dei sistemi neuro-umorale e adrenergico secondaria alla diminuzione dell'eritropoietina.

Tra le indagini riguardanti RDW negli animali d'affezione con diverse patologie rientra anche lo studio di Stanzani et al. del 2015 che ha indagato il valore di RDW nei gatti affetti da cardiomiopatia ipertrofica (*hypertrophic cardiomyopathy*, HCM).

Il primo obiettivo era determinare se RDW differisse tra controlli sani, gatti con HCM e gatti con HCM e CHF. Il secondo scopo dell'indagine era capire se i valori di RDW alla presentazione potessero fornire utili informazioni prognostiche.

I risultati hanno dimostrato che RDW era significativamente maggiore nei gatti con HCM e CHF rispetto ai gatti con HCM, ma senza CHF e ai gatti di controllo.

Il riscontro di maggiore rilevanza clinica, tuttavia, è stato osservare che RDW fornisce informazioni prognostiche utili: un valore di RDW maggiore alla presentazione era associato a un rischio di morte significativamente più elevato nei gatti con HCM. Questo aspetto è rimasto statisticamente significativo dopo la correzione per presenza di CHF, di uno stato pro-trombotico, di disfunzione sistolica, di un aumento della dimensione atriale sinistra o di un aumento dell'ematocrito.

Ogni singolo aumento di un punto percentuale del valore di RDW è stato associato a un aumento di 1,34 volte del rischio di morte nella popolazione oggetto dello studio.

I potenziali meccanismi che sono stati proposti per spiegare la relazione tra RDW e insufficienza cardiaca includono: stress infiammatorio, carenze nutrizionali, metabolismo del ferro alterato, produzione inadeguata di eritropoietina e l'impatto di comorbidità come la disfunzione epatica e renale. La maggior parte di questi processi condivide percorsi comuni con l'anemia da malattia cronica e l'anemia da malattia grave. Pertanto, RDW potrebbe rappresentare una misura integrativa di diversi processi patologici che si verificano durante l'insufficienza cardiaca e che contribuiscono al risultato clinico.

Infine, uno studio condotto da Roderick e colleghi nel 2017 ha indagato RDW come fattore prognostico nei gatti con malattia cardiaca acquisita con o senza insufficienza cardiaca congestizia.

I valori di RDW sono stati suddivisi in terzili: valori bassi (13,3%–15,4%), medi (15,5%–16,5%) e alti (16,6%–23,4%).

La mediana di RDW era del 16,3% (range 13,6%–19,6%) nel gruppo di studio costituito da soggetti patologici e del 15,8% (range 13,3%–23,4%) nel gruppo di controllo. È stata trovata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ( $P = 0,02$ ).

Allo stesso tempo però, non è stata trovata alcuna associazione statisticamente significativa tra i terzili in cui sono stati divisi i valori di RDW e la mortalità a 30 giorni o 6 mesi né nell'intera coorte né nel gruppo di gatti affetti né nei gruppi di controllo. Dunque, a differenza dei rilievi in medicina umana in pazienti con insufficienza cardiaca, in questo studio sui gatti non è stata trovata alcuna associazione tra la sopravvivenza a 30 giorni o a 6 mesi e il valore RDW.

Uno dei motivi per cui RDW potrebbe non essere un indicatore prognostico adatto nei gatti è rappresentato dalle differenze specie specifiche nella fisiologia dei globuli rossi. Gli eritrociti felini hanno una durata di vita più breve rispetto a quelli umani (70-80 giorni contro 120 giorni), hanno un diametro inferiore (5-6  $\mu\text{m}$ ), contengono un numero maggiore di gruppi di emoglobina sulfidrilica (8-10 contro 2-4) e hanno una marcata formazione di rouleaux, con o senza infiammazione. Il maggior numero di gruppi sulfidrilici e le scorte limitate di glutazione rendono i globuli rossi felini più inclini allo stress ossidativo e alla formazione del corpo di Heinz e possono portare a una maggiore

variabilità nei valori normali di RDW nei gatti rispetto agli esseri umani (Roderick et al., 2017).

Un'ulteriore differenza tra la fisiologia dei globuli rossi felini e umani è dovuta al fatto che i gatti hanno due sottopopolazioni distinte di reticolociti: reticolociti aggregati e puntati (maturi). I gatti sani hanno anche un numero elevato di reticolociti fisiologicamente circolanti (2-17%), rispetto agli adulti umani normali nei quali i reticolociti rappresentano lo 0,5-1,5% dei globuli rossi e quindi possono determinare una distribuzione più uniforme di RDW.

Nonostante le differenze descritte nella fisiologia dei globuli rossi felini rispetto a quelli di altre specie, in analogia con gli studi in medicina umana, è stata rilevata un'associazione tra il valore RDW e la presenza di CHF nei gatti. I gatti con CHF avevano un valore mediano di RDW significativamente aumentato rispetto ai gatti nella popolazione di controllo. Questo suggerisce che i gatti con CHF possano avere livelli aumentati di mediatori infiammatori. Inoltre, sebbene RDW non sembri utile come indicatore prognostico nei gatti con CHF, può essere usato insieme ad altri test per supportare una diagnosi di insufficienza cardiaca congestizia (Roderick et al., 2017).

In conclusione, ad oggi, i diversi studi effettuati su RDW nelle specie di animali d'affezione evidenziano solo limitate analogie con i risultati delle indagini in medicina umana.

I meccanismi fisiopatologici per lo sviluppo di anisocitosi, d'altro canto, non sono ancora completamente noti e i diversi studi effettuati fino ad ora presentano importanti limitazioni come la prevalenza di studi retrospettivi o l'utilizzo di campioni di piccole dimensioni.

Inoltre, considerata l'importanza del riscontro e del possibile utilizzo di un parametro facilmente misurabile ed economico per ottenere informazioni rapide per la diagnosi e la prognosi, è ragionevole istituire ulteriori indagini più approfondite sul significato di RDW e sulla sua correlazione con la sopravvivenza in animali affetti da diverse patologie.

## 4. CONTRIBUTO SPERIMENTALE

RDW o indice di anisocitosi è un parametro laboratoristico semplice e poco costoso che riflette la differenza nella dimensione dei globuli rossi; è stato storicamente utilizzato per la valutazione dei disturbi ematologici nell'uomo e nel cane, in particolare per la diagnosi differenziale delle anemie.

Svariati studi effettuati negli ultimi anni in medicina umana hanno individuato un'associazione tra il valore di RDW e la gravità di diverse patologie sistemiche (disturbi ematologici, malattie cardiovascolari e malattie di altra natura), inoltre un aumento di RDW è stato associato ad una prognosi negativa in pazienti umani affetti da malattie cardiovascolari (malattia coronarica, malattia cerebrovascolare o delle altre arterie periferiche, fibrillazione atriale, ipertensione polmonare e insufficienza cardiaca) (Felker et al., 2007; Lippi et al., 2014; Salvagno et al., 2015; Parizadeh et al., 2019).

A fronte di questi rilievi, anche nell'ambito della medicina veterinaria sono state formulate alcune indagini con lo scopo di ricercare risultati analoghi per quanto riguarda gli animali d'affezione. Ad oggi, alcuni studi retrospettivi di natura osservazionale hanno valutato RDW in animali con diverse patologie effettuando un confronto tra gli animali affetti e un gruppo di controllo costituito da animali sani. Tra i disturbi che sono stati analizzati nel corso di queste indagini si trovano MMVD, ipertensione polmonare, filariosi cardiopolmonare, traumi acuti e diverse malattie endocrine, neurologiche, gastrointestinali, respiratorie e renali (Guglielmini et al., 2013; Swann et al., 2014; Mazzotta et al., 2016; Fish et al., 2017; Martinez et al., 2019). I risultati ottenuti fino ad ora non hanno portato a risposte univoche circa il significato di RDW in corso di patologia, tuttavia i risultati in medicina umana continuano ad incoraggiare nuovi approfondimenti anche in medicina veterinaria sulla valenza prognostica del parametro laboratoristico ematologico.

Il presente studio è incentrato su MMVD ovvero la malattia cardiaca con la più elevata prevalenza nella popolazione canina, si tratta di una patologia progressiva che richiede controlli periodici e che spesso esita in insufficienza cardiaca congestizia, condizione rischiosa per la vita dell'animale. Trovare un parametro economico e facilmente misurabile come RDW, potenzialmente caratterizzato da un significato

prognostico per la sopravvivenza in cani con malattia degenerativa mitralica, potrebbe avere ottimi risvolti clinici nella classificazione del paziente e nell'impostazione di una terapia più o meno aggressiva rispetto a quella descritta nei protocolli.

Ad oggi, nessuno studio ha indagato il significato prognostico di RDW in cani con MMVD.

Il presente studio ha valutato retrospettivamente parametri clinici, ecocardiografici e di laboratorio, tra cui RDW, in una coorte di 146 cani di proprietà con MMVD con un periodo di *follow up* di almeno un anno (Guglielmini et al., 2021).

#### 4.1. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo scopo del presente studio è valutare il ruolo predittivo di RDW per *l'outcome* in cani con MMVD a diversi stadi. L'ipotesi di partenza, elaborata in base ai rilievi in medicina umana e ai riscontri di altri studi in medicina veterinaria, è che RDW sia un marker prognostico indipendente di *outcome* negativo in cani con MMVD, con o senza malattie concomitanti.

Per stimare il valore prognostico di RDW è stato condotto uno studio retrospettivo di coorte raccogliendo i dati di cani affetti da MMVD che sono stati visitati almeno in un'occasione presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) dell'Università degli Studi di Padova con sede a Legnaro (PD). Per questo tipo di indagine è stato preso in considerazione un periodo di circa cinque anni e mezzo.

I dati sono stati estrapolati dal gestionale dell'ospedale Easyvet® ed ulteriori informazioni sono state ottenute a seguito di un'intervista telefonica ai proprietari o al veterinario che ha riferito il caso e mediante la somministrazione di un questionario Google Form® (vedi **Appendice**).

Tutti i proprietari dei cani coinvolti nell'indagine hanno firmato un consenso scritto, in cui sono indicate le procedure diagnostiche e l'eventuale utilizzo dei dati ottenuti a fini di ricerca.

## 4.2. MATERIALI E METODI

### 4.2.1. Animali

L'analisi retrospettiva delle cartelle cliniche dei cani visitati presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico di Legnaro tra gennaio 2014 e luglio 2019 ha portato all'inclusione di 146 animali affetti da MMVD a diversi stadi.

I criteri di inclusione necessari per l'inserimento del caso nella coorte oggetto dell'indagine comprendevano:

- Diagnosi di MMVD definitiva basata sulla presenza di:
  - a. Soffio sistolico apicale sinistro riscontrato durante l'esame fisico in fase di auscultazione del torace
  - b. Lembi valvolari mitralici ispessiti o prolassati osservati all'esame ecocardiografico (2D)
  - c. Rigurgito mitralico individuato con la metodica *color flow Doppler* durante l'esame ecocardiografico
- Classificazione della patologia in base alle linee guida ACVIM 2019 (stadi B1, B2, C, D)
- Disponibilità di dati completi circa esame emocromocitometrico e profilo biochimico effettuati entro un massimo di 72 ore rispetto alla diagnosi di MMVD ottenuta con l'esame ecocardiografico
- Disponibilità di informazioni di *follow up* relative a un periodo di almeno 12 mesi

Sono stati inclusi nello studio anche cani affetti da altre patologie non cardiovascolari mentre i pazienti affetti da patologie cardiache congenite o acquisite sono stati esclusi.

Per ogni animale incluso nella coorte e visitato nell'arco di tempo valutato dallo studio, è stata presa in considerazione la visita più recente che comprendesse esame ecocardiografico ed esami di laboratorio completi.

Per ogni paziente sono stati raccolti dati circa segnalamento, anamnesi, esame obiettivo generale, visita cardiologica con annesso esame ecocardiografico, esami di laboratorio (esame emocromocitometrico e profilo biochimico) e *follow up*.

Per prima cosa, sono stati raccolti i dati identificativi di tutti gli animali considerati nella coorte, utili per costruire il profilo demografico del campione. Nella categoria del segnalamento sono state incluse sia variabili categoriche dicotomiche (sesso maschile o femminile, animale di razza o meticcio) che variabili continue (età e peso corporeo).

Per quanto riguarda l'anamnesi, in primo luogo è stata indagata la storia medica dei pazienti attraverso l'analisi dei referti raccolti su Easyvet® ed è stata registrata l'eventuale presenza di patologie cardiache e non cardiache già diagnosticate prima della visita e ancora manifeste al momento dell'esecuzione degli esami laboratoristici ed ecocardiografici. Poi, sono stati raccolti dati circa le terapie a cui l'animale era già sottoposto al momento dell'ingresso in OVUD. I dati circa il trattamento farmacologico sono stati suddivisi in terapie cardiologiche (furosemide, spironolattone, ACE inibitore, pimobendan e digossina) e terapie per patologie concomitanti non cardiache.

Relativamente alla visita clinica, sono state annotate la frequenza cardiaca e l'eventuale presenza di aritmie. È stata considerata soprattutto la presenza di fibrillazione atriale (diagnosticata con elettrocardiogramma). L'analisi dell'attività elettrica del cuore in alcuni casi è stata eseguita mediante registrazione elettrocardiografica di almeno cinque minuti con uno strumento apposito, più frequentemente è stato osservato il tracciato registrato dall'ecografo in sede di esame ecocardiografico.

I dati desunti dalla visita cardiologica e dalla diagnostica strumentale hanno permesso la distinzione tra animali con insufficienza cardiaca compensata (stadi B1 e B2, ACVIM 2019) e non compensata (stadi C e D, ACVIM 2019).

Inoltre, sono stati segnalati animali con ipertensione polmonare (definita da un livello di velocità massima di rigurgito tricuspide superiore a 3,4 m/s).

#### **4.2.2. Esame ecocardiografico**

L'ecocardiografia trans-toracica, bidimensionale (2D), M-mode ed eco-Doppler, è stata eseguita su animali svegli, seguendo le linee guida stabilite, da due operatori esperti, utilizzando un ecografo (CX50, Philips, Eindhoven, Paesi Bassi) equipaggiato con sonde *phased array* da 1 – 5 e 3 – 8 MHz e con registrazione simultanea del tracciato elettrocardiografico.

Per ogni paziente, l'indagine dei referti degli esami ecocardiografici ha consentito la raccolta dei valori di:

- LVDDn → diametro diastolico del ventricolo sinistro normalizzato per il peso corporeo (*normalized left ventricular diastolic diameter*)
- LVSDn → diametro sistolico del ventricolo sinistro normalizzato per il peso corporeo (*normalized left ventricular systolic diameter*)
- FS% → frazione di accorciamento (*shortening fraction*)
- LA/Ao → rapporto tra diametro dell'atrio sinistro e diametro dell'aorta
- *Mitral E wave peak velocity* → velocità massima dell'onda E (*early*) del flusso transmitralico
- TR Vmax → velocità massima del getto rigurgitante sistolico attraverso la valvola tricuspide

I diametri interni del ventricolo sinistro sono stati misurati a partire da immagini M-mode ottenute dalla proiezione parasternale destra in asse corto a livello delle corde tendinee. La misura dei diametri sistolici e diastolici del ventricolo sinistro si ottiene usando il metodo *leading edge – to – leading edge* (dal primo margine della prima parete riscontrato in direzione prossimo – distale al primo margine della seconda parete riscontrato nella stessa direzione). I diametri diastolici e sistolici (LVDD e LVSD) sono stati poi indicizzati al peso corporeo utilizzando il metodo di Cornell per ottenere delle misure normalizzate (LVDDn e LVSDn).

$$LVDDn = \frac{LVDD}{\text{peso corporeo}^{0,294}}$$

$$LVSDn = \frac{LVSD}{\text{peso corporeo}^{0,315}}$$

Il valore limite fisiologico per il diametro ventricolare diastolico normalizzato è 1,7 (Cornell, 2004).

La frazione di accorciamento del ventricolo sinistro è stata calcolata utilizzando la formula:

$$FS = \left[ \frac{(LVDD - LVSD)}{LVDD} \right] \times 100$$

I diametri dell'atrio sinistro (LA) e della radice aortica (Ao) sono stati misurati in diastole precoce (primo *frame* dopo la chiusura della valvola aortica) in proiezione parasternale destra in asse corto a livello della base del cuore usando un metodo in due dimensioni. I due valori ottenuti sono stati poi messi in rapporto.

Il flusso sanguigno transmitralico è stato visualizzato in proiezione parasternale sinistra apicale a quattro camere utilizzando la modalità Doppler spettrale pulsato. Il volume campione da considerare per indagare profilo e velocità del flusso ematico si trova a livello del margine libero della valvola mitrale. Per ogni passaggio attraverso l'ostio atrioventricolare sono state misurate le velocità di picco dell'onda E (*early diastolic*) e dell'onda A (*late diastolic*).

Anche il rigurgito tricuspидale è stato visualizzato in proiezione apicale sinistra a quattro camere e la sua velocità massima è stata misurata ricorrendo nuovamente alla modalità Doppler spettrale.

Ogni parametro ecocardiografico riportato sui referti e utilizzato poi per l'analisi statistica è dato dalla media di tre misurazioni ripetute effettuate a partire dalle immagini acquisite nell'animale sveglio.

La presenza di PH è stata valutata in tutti i cani senza evidenza ecocardiografica di ostruzione al flusso ventricolare destro e con un rigurgito tricuspидale misurabile. La soglia individuata per discriminare i cani con PH equivale ad una velocità di picco di TR  $\geq 3,4$  m / s, e ad un corrispondente gradiente di pressione di rigurgito tricuspидale  $\geq 46$  mmHg. Nei cani senza TR registrabile, non è stato possibile determinare lo stato di pressione polmonare.

#### **4.2.3. Esami di laboratorio**

Per ogni animale sono stati raccolti i referti dell'esame emocromocitometrico e del profilo biochimico. Le analisi emato-biochimiche sono state sempre eseguite entro le 24 ore dal momento del prelievo del sangue.

Il sangue è stato prelevato dalla vena cefalica o dalla vena giugulare di cani a digiuno da almeno 12 ore e non sedati.

Per l'esame emocromocitometrico è stato analizzato il sangue intero conservato con K3 EDTA, mentre per il profilo biochimico è stato analizzato il siero ottenuto per centrifugazione.

Le variabili ematologiche, tra cui RDW, sono state misurate utilizzando un emocitometro automatizzato ADVIA 120 (Advia 120, Hematology system, Siemens, Monaco, Germania); le variabili contenute nel profilo biochimico analizzate sul siero sono state valutate utilizzando un apposito strumento (AU 400, Mishima Olympus, Shizuoka, Giappone).

I controlli di qualità interni forniti dai produttori "*Test Point Normal Control*" e "*Normal and Pathologic*" sono stati eseguiti giornalmente rispettivamente per l'analisi ematologica e biochimica. Il controllo di qualità esterno è stato eseguito per entrambi gli strumenti utilizzando materiale di controllo umano settimanalmente (*Bio-Rad Laboratories*, Segrate, Italia) e mensilmente secondo EQA-RQAS (*External Quality Assessment - Randox International Quality Assessment Scheme*).

Per quanto riguarda l'esame emocromocitometrico sono stati considerati i valori di:

- Globuli bianchi - WBC ( $10^3/\text{ml}$ ),
- Globuli rossi - RBC ( $10^6/\text{ml}$ ),
- Emoglobina – Hb (g/dl),
- Ematocrito – Hct (%),
- Ampiezza di distribuzione eritrocitaria – RDW (%),
- Volume cellulare medio – MCV (fL),
- Piastrine – PLT ( $10^3/\mu\text{l}$ ).

L'intervallo di riferimento per RDW va da 13,3% a 14,9%.

Tra i risultati del profilo biochimico sono stati registrati i valori di:

- Azotemia – BUN (mg/dl),
- Creatininemia – Crea (mg/dl),
- Albumina – Alb (g/l),
- Proteine totali – PT (g/l)

#### 4.2.4. Indagine del follow up

Nel presente studio, un criterio di inclusione imprescindibile era rappresentato dalla presenza di un *follow up* di almeno un anno dall'ultima visita considerata per la raccolta di dati.

L'indagine del *follow up* è stata eseguita in parte analizzando i dati archiviati sul gestionale dell'Ospedale (Easyvet®) e in parte attraverso interviste telefoniche ai proprietari. Una porzione più ridotta di proprietari è stata intervistata mediante l'uso di un questionario *Google form*® (vedi **Appendice**).

Ogni chiamata prevedeva la raccolta di dati circa la sopravvivenza dell'animale (ancora vivo o deceduto), la data di decesso e la causa di morte (cardiaca/non cardiaca, naturale/eutanasia).

Per ogni paziente è stato calcolato il tempo di sopravvivenza in giorni trascorso dall'ultima visita alla morte o all'ultimo contatto con il proprietario nel caso di animali ancora vivi al momento dello studio.

Le telefonate sono state effettuate in settembre 2020, dunque tutti gli animali ancora vivi al momento dell'ultimo contatto telefonico presentavano una sopravvivenza sicuramente superiore all'anno rispetto alla visita considerata per lo studio (i dati più recenti corrispondono ad un paziente visitato il 30.07.2019).

La raccolta dei dati ha permesso la suddivisione dei cani in due gruppi:

- Sopravvivenza > 6 mesi (ancora vivi al momento del contatto con il proprietario o con follow up indicativo di sopravvivenza superiore a sei mesi dall'ultima visita)
- Sopravvivenza < 6 mesi (follow up indicativo di morte per qualsiasi causa a meno di 6 mesi dall'ultima visita)

I cani, dunque, sono stati classificati come ancora vivi, morti per qualsiasi causa o non rintracciabili in fase di *follow up* quando non erano disponibili ulteriori dati dopo la presentazione in Ospedale. Per ogni caso, è stato registrato il tempo in giorni dalla diagnosi di MMVD alla morte (tempo di sopravvivenza) o alla telefonata nel caso dei soggetti ancora vivi (tempo di follow-up). I cani ancora vivi alla fine del periodo di osservazione sono stati censurati.

#### 4.2.5. Analisi statistica

I dati raccolti riguardanti segnalamento, anamnesi (comorbidità, terapie già somministrate), visita cardiologica con esame ecocardiografico, esami di laboratorio e sopravvivenza degli animali affetti da malattia mitralica sono stati tabulati in un database Excel®. L'analisi dei dati è stata poi eseguita utilizzando *software* statistici disponibili in commercio (SAS versione 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA; MedCalc versione 12.6.1.0, MedCalc Software, Ostenda, Belgio).

In base alla durata della sopravvivenza calcolata dal momento della raccolta dei dati ecocardiografici/di laboratorio, sono stati presi in considerazione due gruppi di animali: cani sopravvissuti oltre sei mesi e cani sopravvissuti meno di sei mesi dall'ultima valutazione clinica e strumentale.

L'eventuale normalità della distribuzione delle variabili cliniche, ecocardiografiche e di laboratorio inserite nel database è stata valutata con il test di Shapiro Wilk. La distribuzione normale ha alcune importanti caratteristiche: se rappresentata graficamente presenta una forma campanulare e simmetrica, le sue misure di posizione centrale (valore atteso, mediana) coincidono e il suo range interquartile è pari a 1.33 volte lo scarto quadratico medio, cioè copre un intervallo compreso tra  $\mu$  (media)  $- 2/3\sigma$  (deviazione standard) e  $\mu + 2/3\sigma$ .

I dati con una distribuzione normale sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard, mentre per i dati distribuiti in modo non normale sono stati considerati la mediana e il range. Le variabili categoriche sono state presentate come conteggi di frequenza e percentuali.

Come secondo passaggio dell'analisi statistica, è stato eseguito un confronto tra il gruppo di cani sopravvissuti oltre sei mesi e il gruppo di cani sopravvissuti meno di sei mesi indagando la presenza di differenze statisticamente rilevanti per quanto riguarda i diversi parametri valutati pertinenti a segnalamento, anamnesi, ecocardiografia, esami di laboratorio e sopravvivenza.

I parametri caratterizzati da una distribuzione normale sono stati analizzati con il test del t di Student, mentre i dati distribuiti in modo non normale sono stati valutati con il test di Mann Whitney non parametrico.

Le variabili dicotomiche o categoriche (sesso, razza, presenza di scompenso, presenza di aritmia, presenza di ipertensione polmonare, presenza di comorbidità/assunzione di terapia all'ingresso) sono state analizzate con il test del chi-quadro.

A prescindere del modello statistico utilizzato per confrontare i due gruppi, è stata considerata una significatività statistica per valori di  $p$  inferiori a 0,05.

Questa prima fase di analisi statistica ha consentito di costruire una panoramica delle caratteristiche del campione coinvolto nello studio di coorte e di impostare una comparazione tra i due gruppi considerati.

Una volta valutata la popolazione nel complesso e dopo aver messo in evidenza le differenze statisticamente significative tra i gruppi, è stata valutata la correlazione dei diversi parametri clinici, ecocardiografici e laboratoristici con il valore di RDW e con la lunghezza del periodo di sopravvivenza dalla diagnosi espresso in giorni.

La correlazione tra le variabili è stata valutata mediante il coefficiente di correlazione di Spearman ( $R$ ) che misura il grado di relazione tra due variabili. Il coefficiente assume valori tra -1 e 1, il segno della correlazione indica la direzione dell'associazione tra le due variabili  $X$  e  $Y$  (per esempio, se  $R$  è negativo significa che  $X$  tende ad aumentare al diminuire di  $Y$ ). Un valore di  $R$  uguale o prossimo a zero indica che non c'è alcuna tendenza di  $Y$  ad aumentare o a diminuire al variare di  $X$ . Anche in questo caso è stato attribuito un significato statisticamente rilevante alle correlazioni con  $p < 0,05$ .

L'analisi statistica si è poi diretta verso l'obiettivo dello studio ovvero l'indagine di un eventuale valore prognostico di RDW.

Tutti i parametri pertinenti alle diverse aree indagate (segnalamento, anamnesi, parametri ecocardiografici, parametri laboratoristici) sono stati inclusi in un'analisi univariata impostata per determinare se esistesse una relazione significativa tra le variabili cliniche, ecocardiografiche e di laboratorio, incluso RDW, e la sopravvivenza. *L'endpoint* era la morte per qualsiasi causa entro sei mesi dalla diagnosi.

Per ogni variabile è stato calcolato *l'hazard ratio* (HR) che può essere interpretato come l'aumento della possibilità di verificarsi di un evento in un gruppo con una precisa caratteristica rispetto al gruppo senza tale carattere (per esempio, se HR è uguale a 2 per il gruppo con il carattere  $X$  significa che gli animali con  $X$  presentano una probabilità doppia di andare incontro all'*outcome* rispetto a quelli privi di  $X$ ).

Le variabili con  $P < 0,1$  nell'analisi univariata sono state poi incluse anche nell'analisi multivariata del rischio (modello di Cox) per identificare i valori predittivi indipendenti di morte entro sei mesi.

Sia per l'analisi univariata che per l'analisi multivariata, sono stati considerati significativi i valori con  $p < 0,05$ .

Infine, per confrontare la lunghezza della sopravvivenza di cani con valori diversi di RDW sono state utilizzate le curve di Kaplan Meyer.

I cani sono stati divisi in tre gruppi in base al valore di RDW (terzili):

- Primo gruppo: RDW  $< 13,6\%$ ,
- Secondo gruppo: RDW incluso tra  $13,6\%$  e  $14,4\%$ ,
- Terzo gruppo: RDW  $> 14,4\%$ .

Per ogni gruppo è stata costruita una curva inserita all'interno di un piano cartesiano che presenta in ascissa la durata della sopravvivenza in giorni e in ordinata la probabilità di sopravvivenza (numero di animali ancora vivi sul totale).

I risultati della costruzione delle curve sono poi stati confrontati al livello 0,5 in ordinata per valutare la presenza di differenze significative ( $p < 0,05$ ) tra i tre gruppi. Il primo gruppo, ovvero il primo terzile dei possibili valori di RDW, costituiva il range di riferimento con il quale sono stati confrontati il secondo e il terzo terzile.

### **4.3. RISULTATI**

#### **4.3.1. Animali**

Un totale di 146 cani (60,3% maschi e 39,7% femmine) di razze diverse, inclusi 84 cani meticci (57,5%), hanno soddisfatto i criteri di inclusione.

L'età media era di  $143 \pm 35$  mesi e il peso corporeo mediano era di 9 kg (2 - 38 kg).

Al momento dell'inclusione (visita in OVUD considerata per lo studio), 65 cani (44,5%) non ricevevano alcun trattamento, mentre 81 cani (55,5%) ricevevano uno o più farmaci per il controllo della MMVD, per malattie non cardiache concomitanti o per entrambe.

Trentuno cani (21,2%) presentavano malattie non cardiache concomitanti, tra queste c'erano malattie neurologiche (10 casi), respiratorie (9 casi), neoplastiche (4 casi), a

carico dell'apparato genitale (3 casi), endocrine (2 casi), urinarie (2 casi) e di natura traumatica (1 caso).

Cinquantasei cani (38,4%) non avevano altre malattie concomitanti e non ricevevano alcun trattamento; 44 cani (30,1%) ricevevano uno o più farmaci per MMVD; 16 cani (11%) ricevevano uno o più farmaci sia per MMVD sia per malattie concomitanti o avevano una malattia concomitante non trattata. Infine, 30 cani (20,5%) ricevevano uno o più farmaci solo per malattie concomitanti o avevano una malattia concomitante non trattata.

La **Tabella 5** riassume il tipo di trattamento e i farmaci somministrati ai pazienti inclusi nello studio.

Quarantasette cani assumevano una terapia cardiologica, 13 cani (8,9%) assumevano una terapia mista (contemporaneamente cardiologica e non), 21 (14,4%) cani assumevano altre terapie per affezioni non cardiologiche concomitanti e 65 (44,5%) cani non assumevano alcun tipo di farmaco.

| <b>Tipo di terapia</b>                                   | <b>Numero di cani trattati (%)</b> |
|--|------------------------------------|
| <b>Terapia cardiologica</b>                              | <b>47 (32,2)</b>                   |
| - Diuretici d'ansa                                       | 36 (24,7)                          |
| - ACE inibitori  | 32 (21,9)                          |
| - Pimobendan   | 26 (17,8)                          |
| - Spironolattone   | 7 (4,8)                            |
| - Digossina  | 1 (0,7)                            |
| <b>Terapia mista (per affezioni cardiologiche e non)</b> | <b>13 (8,9)</b>                    |
| - ACE inibitori  | 10 (6,8)                           |
| - Pimobendan   | 6 (4,1)                            |
| - Diuretici d'ansa                                       | 6 (4,1)                            |
| - Steroidi   | 6 (4,1)                            |
| - Antibiotici  | 2 (1,4)                            |
| - Anticonvulsivanti                                      | 2 (1,4)                            |
| - Epatoprotettori  | 2 (1,4)                            |

|  |                  |
|--|------------------|
| - FANS (antinfiammatori non steroidei)   | 1 (0,7)          |
| - Antiacidi e antiemetici                | 1 (0,7)          |
| - Vitamine o altri integratori           | 1 (0,7)          |
| <b>Altre terapie (non cardiologiche)</b> | <b>21 (14,4)</b> |
| - Antibiotici                            | 4 (2,7)          |
| - Anticonvulsivanti                      | 4 (2,7)          |
| - Steroidi                               | 2 (1,4)          |
| - Antiacidi e antiemetici                | 2 (1,4)          |
| - Propentofillina                        | 2 (1,4)          |
| - Levotiroxina                           | 2 (1,4)          |
| - Epatoprotettori                        | 2 (1,4)          |
| - FANS (antinfiammatori non steroidei)   | 1 (0,7)          |
| - Gabapentin                             | 1 (0,7)          |
| - Trilostano                             | 1 (0,7)          |
| - Vitamine e altri integratori           | 1 (0,7)          |
| - Antiandrogeni                          | 1 (0,7)          |
| - Fenilpropanolamina                     | 1 (0,7)          |
| <b>Nessuna terapia</b>                   | <b>65 (44,5)</b> |

*Tabella 5. Tipo di trattamento e farmaci somministrati ai 146 cani inclusi nello studio*

Novantacinque cani (65,1%) sono stati inseriti in classi di MMVD compensata (stadio B1 e B2), mentre 51 cani (34,9%) presentavano una condizione di MMVD scompensata (stadio C e D).

La fibrillazione atriale è stata diagnosticata in 5 cani (3,4%).

Centoventi cani presentavano un valore di rigurgito tricuspide (*tricuspidal regurgitation*, TR) registrabile ecocardiograficamente (82,8%) e PH è stata diagnosticata in 18 di questi (12,3%). Nei restanti 26 cani (17,8%) non sono stati riscontrati né TR né insufficienza polmonare e, pertanto, non è stato possibile valutare lo stato di pressione polmonare.

Tra i 146 cani arruolati, 34 (23,3%) presentavano un valore di RDW > 14.9% ovvero sopra al limite di riferimento superiore.

Alla fine del periodo di *follow up*, 41 cani (28,1%) erano morti entro sei mesi dalla diagnosi (tempo di sopravvivenza mediano 70 giorni, range 1–176 giorni) e 105 cani (71,9%) erano ancora vivi dopo sei mesi dalla diagnosi (tempo mediano di *follow up* 575 giorni, range 190-2000 giorni).

#### 4.3.2. Variabili ecocardiografiche e laboratoristiche

Le caratteristiche dei 146 cani inclusi nella coorte di studio, compresi i dati clinici, di laboratorio ed ecocardiografici sono riassunte nella **Tabella 6**. La prima colonna indica la variabile considerata, la seconda colonna esprime il valore rappresentativo per la popolazione complessiva (media e deviazione standard per le variabili con distribuzione normale, mediana e range per le variabili con distribuzione non normale, percentuale o frequenza per le variabili categoriche). La terza e la quarta colonna esprimono i valori rappresentativi rispettivamente per la popolazione di animali morti entro 6 mesi e per il gruppo di animali sopravvissuti oltre i 6 mesi. Queste ultime due colonne sono state messe a confronto per individuare differenze significative tra i due gruppi oggetto dell'indagine.

Nel gruppo dei cani morti entro sei mesi la mediana dell'urea sierica e dei globuli bianchi (*white blood cells*, WBC) è risultata significativamente più alta rispetto a quella dei cani vivi oltre sei mesi ( $P = 0,001$  e  $P < 0,001$ , rispettivamente). Inoltre, i cani morti entro 6 mesi avevano le medie del rapporto LA/Ao e della velocità massima dell'onda E significativamente più elevate rispetto a quelle dei cani con sopravvivenza più lunga ( $P = 0,004$  e  $P = 0,027$ , rispettivamente). Infine, la percentuale di cani senza alcun trattamento al momento della diagnosi era significativamente più alta nel gruppo di animali ancora in vita a sei mesi dall'arruolamento ( $P = 0,002$ ).

| <b>Variabile</b>   | <b>Numero di animali totale (n = 146)</b> | <b>Cani morti entro 6 mesi (n = 41)</b> | <b>Cani ancora vivi dopo 6 mesi (n = 105)</b> | <b>P - value</b> |
|--------------------|---|---|---|------------------|
| Età (mesi)         | 143 ± 35                                  | 152 ± 32                                | 140 ± 36                                      | 0,057            |
| Peso (kg)          | 9 (2 - 38)                                | 8 (2 - 38)                              | 9 (2 - 33)                                    | 0,979            |
| Sesso (F/M)        | 58/88                                     | 19/22                                   | 39/66   | 0,410            |
| Razza pura (n [%]) | 62 (42,5)                                 | 22 (53,7)                               | 40 (38,1)                                     | 0,128            |

|   |                      |                      |                     |        |
|---|----------------------|----------------------|---------------------|--------|
| Assenza di trattamento (n [%])                    | 56 (38,4)            | 8 (19,5)             | 48 (45,7)           | 0,002  |
| Trattamento cardiologico (n [%])                  | 44 (30,1)            | 16 (39,0)            | 28 (26,7)           | 0,223  |
| Trattamento misto/presenza di comorbidità (n [%]) | 16 (11,0)            | 7 (17,1)             | 9 (8,6)             | 0,294  |
| Altri trattamenti/presenza di comorbidità (n [%]) | 30 (20,5)            | 10 (24,4)            | 20 (19,0)           | 0,637  |
| Stadio ACVIM C+D (n [%])                          | 51 (34,9)            | 20 (48,8)            | 31 (29,5)           | 0,051  |
| FA (n [%])  | 5 (3,4)              | 2 (4,9)              | 3 (2,9)             | 0,458  |
| Ipertensione polmonare (n [%])                    | 18 (12,3)            | 6 (14,6)             | 12 (11,4)           | 0,812  |
| Urea (mg/dL)                                      | 43 (16 - 202)        | 60 (21 - 202)        | 40 (16 - 138)       | 0,001  |
| Proteine totali (g/L)                             | 71,4 ± 7,8           | 70,3 ± 9,8           | 71,9 ± 6,9          | 0,266  |
| Albumina (g/L)                                    | 29,7 ± 4,8           | 29,1 ± 5,8           | 30,3 ± 3,6          | 0,137  |
| Creatinina (mg/dL)                                | 1,05 (0,57 – 3,02)   | 1,09 (0,57 – 2,39)   | 1,05 (0,60 – 3,02)  | 0,318  |
| Globuli bianchi (10 <sup>3</sup> /μL)             | 11,42 (4,85 – 48,54) | 14,02 (6,05 – 48,54) | 9,92 (4,85 – 39,31) | <0,001 |
| Globuli rossi (10 <sup>6</sup> /μL)               | 6,92 ± 1,01          | 6,96 ± 1,26          | 6,9 ± 0,9           | 0,737  |
| Emoglobina (g/dL)                                 | 16,2 ± 2,4           | 16,3 ± 2,9           | 16,1 ± 2,1          | 0,667  |
| Ematocrito (%)                                    | 46,2 ± 6,8           | 46,7 ± 8,5           | 46,0 ± 6,1          | 0,606  |
| RDW (%)   | 14,0 (12,1 – 21,8)   | 14,0 (12,2 – 18,9)   | 13,9 (12,1 – 21,8)  | 0,708  |
| MCV – volume cellulare medio (fL)                 | 67,0 ± 4,3           | 67,4 ± 4,8           | 66,8 ± 4,2          | 0,499  |

|                                 |               |               |               |       |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|-------|
| Piastrine (10 <sup>3</sup> /μL) | 361,2 ± 135,6 | 344,7 ± 149,2 | 367,6 ± 130,0 | 0,361 |
| LA/Ao                           | 2,07 ± 0,68   | 2,33 ± 0,67   | 1,97 ± 0,66   | 0,004 |
| LVDDn                           | 1,76 ± 0,37   | 1,83 ± 0,4    | 1,74 ± 0,36   | 0,219 |
| LVSDn                           | 0,98 ± 0,22   | 0,99 ± 0,24   | 0,97 ± 0,21   | 0,651 |
| FS (%)                          | 41,9 ± 9,6    | 42,1 ± 11,9   | 41,8 ± 8,6    | 0,875 |
| E-max (cm/s)                    | 104,0 ± 40,0  | 115,6 ± 37,9  | 99,3 ± 40,1   | 0,027 |
| TR Vmax (m/s)                   | 2,72 ± 0,73   | 2,89 ± 0,8    | 2,66 ± 0,69   | 0,115 |

n: numero di cani; ACVIM: *American College of Veterinary Internal Medicine*; FA: fibrillazione atriale; RDW: ampiezza di distribuzione eritrocitaria (*Red blood cell distribution width*); MCV: volume corpuscolato medio (*Mean corpuscular volume*); LA/Ao: rapporto tra atrio sinistro e diametro della radice aortica; LVDDn: diametro diastolico del ventricolo sinistro normalizzato per il peso corporeo (*Left ventricular diastolic diameter normalized for body weight*); LVSDn: diametro sistolico del ventricolo sinistro normalizzato per il peso corporeo (*Left ventricular systolic diameter normalized for body weight*); FS: frazione di accorciamento (*Fractional shortening*); E-max: picco di velocità dell'onda E transmitralica; TR Vmax: picco di velocità del rigurgito tricuspideale

**Tabella 6.** Dati clinici relativi alla coorte di animali inclusi nello studio e comparazione tra i cani morti entro sei mesi e i cani vivi con oltre 6 mesi di follow up.

#### 4.3.3. Coefficiente di correlazione e analisi della sopravvivenza

I valori del coefficiente di Spearman, insieme al relativo valore di p per attestare il livello di significatività statistica, mostrano l'eventuale correlazione delle variabili cliniche, di laboratorio ed ecocardiografiche con RDW e con la lunghezza della sopravvivenza (vedi **Tabella 7**).

L'età e le proteine totali sieriche presentano una debole correlazione positiva con RDW. La presenza di insufficienza cardiaca scompensata (cioè, appartenenza dell'animale allo stadio ACVIM C o D), il numero dei globuli rossi per microlitro, la concentrazione di emoglobina, l'ematocrito, il volume corpuscolare medio e LVDDn presentano una debole correlazione negativa con RDW.

Inoltre, età, presenza di insufficienza cardiaca scompensata, assunzione di trattamento cardiaco o misto, concentrazione di urea ematica, numero di globuli bianchi per microlitro, RDW, LA/Ao, LVDDn, E-max e TR Vmax sono significativamente e negativamente, ma debolmente correlati alla sopravvivenza a sei mesi.

| <b>Variabile</b>  | <b>RDW</b> | <b>P - value</b> | <b>Sopravvivenza<br/>(giorni)</b> | <b>P - value</b> |
|---|------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
| Età (mesi)  | 0,206      | 0,013            | - 0,261                           | 0,002            |
| Peso (kg)   | 0,091      | 0,275            | - 0,092                           | 0,268            |
| Sesso - maschile  | - 0,047    | 0,575            | 0,039                             | 0,638            |
| Razza – pura razza  | 0,059      | 0,480            | - 0,041                           | 0,623            |
| Trattamento cardiaco vs<br>Nessun trattamento             | 0,159      | 0,113            | -0,359                            | <0,001           |
| Trattamento<br>misto/comorbidità vs<br>Nessun trattamento | 0,087      | 0,468            | -0,301                            | 0,010            |
| Altro<br>trattamento/comorbidità vs<br>Nessun trattamento | 0,075      | 0,494            | -0,151                            | 0,164            |
| Stadi ACVIM C+D   | -0,211     | 0,011            | - 0,265                           | 0,001            |
| FA  | 0,031      | 0,707            | - 0,123                           | 0,139            |
| Ipertensione polmonare                                    | 0,101      | 0,226            | - 0,122                           | 0,142            |
| Urea (mg/dL)  | 0,109      | 0,191            | - 0,342                           | < 0,001          |
| Proteine totali (g/L)                                     | 0,188      | 0,024            | 0,082                             | 0,326            |
| Albumina (g/L)  | 0,007      | 0,936            | 0,142                             | 0,087            |
| Creatinina (mg/dL)  | 0,031      | 0,712            | - 0,135                           | 0,105            |
| Globuli bianchi (10 <sup>3</sup> /μL)                     | - 0,056    | 0,499            | - 0,388                           | < 0,001          |
| Globuli rossi (10 <sup>6</sup> /μL)                       | - 0,193    | 0,020            | 0,054                             | 0,516            |
| Emoglobina (g/dL)   | - 0,329    | < 0,001          | 0,051                             | 0,540            |
| Ematocrito (%)  | - 0,322    | < 0,001          | 0,061                             | 0,462            |
| RDW (%)   | NM         | NM               | - 0,171                           | 0,040            |
| MCV (fL)  | - 0,277    | 0,001            | 0,030                             | 0,718            |
| Piastrine (10 <sup>3</sup> /μL)                           | 0,119      | 0,152            | - 0,035                           | 0,677            |
| LA/Ao   | - 0,123    | 0,138            | - 0,352                           | < 0,001          |
| LVDDn   | - 0,246    | 0,003            | - 0,175                           | 0,034            |
| LVSDn   | - 0,163    | 0,050            | - 0,144                           | 0,082            |

|                   |         |       |         |       |
|-------------------|---------|-------|---------|-------|
| FS (%)            | - 0,024 | 0,778 | - 0,015 | 0,861 |
| E-max (cm/s)      | - 0,087 | 0,300 | - 0,282 | 0,001 |
| TR Vmax (m/s)     | 0,094   | 0,306 | - 0,249 | 0,006 |
| Sopravvivenza (d) | - 0,171 | 0,040 | NM      | NM    |

ACVIM: American College of Veterinary Internal Medicine; FA: fibrillazione atriale; RDW: ampiezza di distribuzione eritrocitaria (*Red blood cell distribution width*); MCV: volume corpuscolato medio (*Mean corpuscular volume*); LA/Ao: rapporto tra atrio sinistro e diametro della radice aortica; LVDDn: diametro diastolico del ventricolo sinistro normalizzato per il peso corporeo (*Left ventricular diastolic diameter normalized for body weight*); LVSDn: diametro sistolico del ventricolo sinistro normalizzato per il peso corporeo (*Left ventricular systolic diameter normalized for body weight*); FS: frazione di accorciamento (*Fractional shortening*); E-max: picco di velocità dell'onda E transmitralica; TR Vmax: picco di velocità del rigurgito tricuspide; NM: non misurabile

**Tabella 7.** Coefficienti di correlazione di Spearman delle variabili cliniche, laboratoristiche ed ecocardiografiche con RDW e con la sopravvivenza a sei mesi.

I risultati dell'analisi univariata del rischio (modello di Cox) per individuare i fattori predittivi di mortalità per qualsiasi causa entro sei mesi sono mostrati nella **Tabella 8**. Per ognuna delle variabili indagate, sono riportati HR e il rispettivo intervallo di confidenza del 95% (*95% confidence interval, 95% CI*); perché HR abbia un significato entrambi gli estremi considerati dall'intervallo di confidenza devono essere superiori a 1. Il valore di chi quadrato (*chi square*) serve per verificare la validità dell'ipotesi statistica. In questo primo step analitico, dodici variabili, tra cui alcuni parametri clinici (cioè età, somministrazione di trattamento cardiologico, presenza di scompenso cardiaco e di FA), di laboratorio (cioè, concentrazione ematica di urea, WBC e RDW) ed ecocardiografici (cioè, LA/Ao, LVDDn, LVSDn, E-max e TR Vmax) sono risultati significativamente indicatori di un esito negativo.

| Fattori predittivi | Hazard ratio (HR) | 95% CI      | Chi square | P - value |
|--------------------|-------------------|-------------|------------|-----------|
| Età (mesi)         | 1,008             | 1,002-1,013 | 7,960      | 0,005     |
| Peso (kg)          | 1,028             | 0,999-1,057 | 3,514      | 0,061     |
| Sesso - Maschile   | 1,152             | 0,770-1,724 | 0,474      | 0,491     |
| Razza- Pura razza  | 0,815             | 0,547-1,213 | 1,016      | 0,313     |

|   |       |              |        |        |
|---|-------|--------------|--------|--------|
| Trattamento cardiaco vs Nessun trattamento  | 2,001 | 1,235-3,241  | 7,946  | 0,005  |
| Trattamento misto/comorbidità vs Nessun trattamento   | 1,828 | 0,886-3,770  | 2,667  | 0,1024 |
| Altro trattamento/comorbidità vs Nessun trattamento   | 0,989 | 0,583-1,678  | 0,002  | 0,966  |
| Stadio ACVIM C+D  | 1,870 | 1,212-2,886  | 7,999  | 0,005  |
| FA  | 3,896 | 1,213-12,514 | 5,218  | 0,022  |
| Ipertensione polmonare  | 1,876 | 0,998-3,526  | 3,813  | 0,051  |
| Urea (mg/dL)  | 1,017 | 1,007-1,026  | 11,893 | <0,001 |
| Proteine totali (g/L)   | 1,016 | 0,988-1,046  | 1,246  | 0,264  |
| Albumina (g/L)  | 1,044 | 0,986-1,105  | 2,209  | 0,137  |
| Creatinina (mg/dL)  | 1,600 | 0,989-2,589  | 3,666  | 0,055  |
| Globuli bianchi (10 <sup>3</sup> /μL)   | 1,043 | 1,007-1,080  | 5,527  | 0,019  |
| Globuli rossi (10 <sup>6</sup> /μL)   | 0,927 | 0,744-1,155  | 0,458  | 0,498  |
| Emoglobina (g/dL)   | 0,960 | 0,873-1,055  | 0,733  | 0,392  |
| Ematocrito (%)  | 0,980 | 0,948-1,012  | 1,529  | 0,216  |
| RDW (%)   | 1,245 | 1,103-1,405  | 12,609 | <0,001 |
| MCV (fL)  | 0,971 | 0,925-1,019  | 1,419  | 0,234  |
| Piastrine (10 <sup>3</sup> /μL)   | 1,001 | 1,000-1,002  | 1,913  | 0,167  |
| LA/Ao   | 2,108 | 1,488-2,987  | 17,582 | <0,001 |
| LVDDn   | 2,053 | 1,115-3,779  | 5,330  | 0,021  |
| LVSDn   | 2,949 | 1,182-7,353  | 5,380  | 0,020  |
| FS (%)  | 0,998 | 0,977-1,021  | 0,022  | 0,883  |
| E-max (cm/s)  | 1,008 | 1,003-1,014  | 8,802  | 0,003  |
| TR Vmax (m/s)   | 1,559 | 1,117-2,177  | 6,797  | 0,009  |
| ACVIM: American College of Veterinary Internal Medicine; FA: fibrillazione atriale; RDW: ampiezza di distribuzione eritrocitaria ( <i>Red blood cell distribution width</i> ); MCV: volume corpuscolato medio ( <i>Mean corpuscular volume</i> ); LA/Ao: rapporto tra atrio sinistro e diametro della radice aortica; LVDDn: diametro |       |              |        |        |

diastolico del ventricolo sinistro normalizzato per il peso corporeo (*Left ventricular diastolic diameter normalized for body weight*); LVSDn: diametro sistolico del ventricolo sinistro normalizzato per il peso corporeo (*Left ventricular systolic diameter normalized for body weight*); FS: frazione di accorciamento (*Fractional shortening*); E-max: picco di velocità dell'onda E transmitralica; TR Vmax: picco di velocità del rigurgito tricuspide

**Tabella 8.** Analisi univariata del rischio (modello di Cox) di morte a sei mesi in cani affetti da MMVD

Delle 12 variabili significative nel modello univariato, solo quattro sono rimaste significative nel modello multivariato finale: la concentrazione ematica di urea, il rapporto LA/Ao, il valore di RDW e la concentrazione ematica di globuli bianchi (vedi **Tabella 9**). Anche per questo passaggio statistico, per ogni variabile è stato espresso il valore di HR accompagnato dal relativo intervallo di confidenza, la validità dell'ipotesi statistica è stata invece quantificata dal *chi square*.

Sebbene la concentrazione ematica di urea rappresenti il più forte predittore di mortalità in base al valore del *chi square* (9,000), il rapporto LA/Ao presenta il più alto HR di morte (HR = 1,892; 95% CI = 1,232-2,905; P = 0,004) seguito da RDW (HR = 1,203, IC 95% = 1,045-1,384; P = 0,010). La concentrazione ematica di globuli bianchi, analogamente alle variabili precedenti, presenta un significato statistico (P = 0.030), ma il valore di HR è nettamente più basso rispetto a quello relativo a RDW o al rapporto LA/Ao.

| Fattori predittivi                    | Hazard ratio | 95% CI        | Chi square | P-value |
|---------------------------------------|--------------|---------------|------------|---------|
| Urea ematica (mg/dL)                  | 1,016        | 1,005 – 1,026 | 9,000      | 0,003   |
| Globuli bianchi (10 <sup>3</sup> /μL) | 1,043        | 1,004 – 1,083 | 4,734      | 0,030   |
| RDW (%)                               | 1,203        | 1,045 – 1,384 | 6,624      | 0,010   |
| LA/Ao                                 | 1,892        | 1,232 – 2,905 | 8,478      | 0,004   |

RDW: Ampiezza di distribuzione eritrocitaria (*Red blood cell distribution width*); LA/Ao: rapporto tra atrio sinistro e diametro della radice aortica

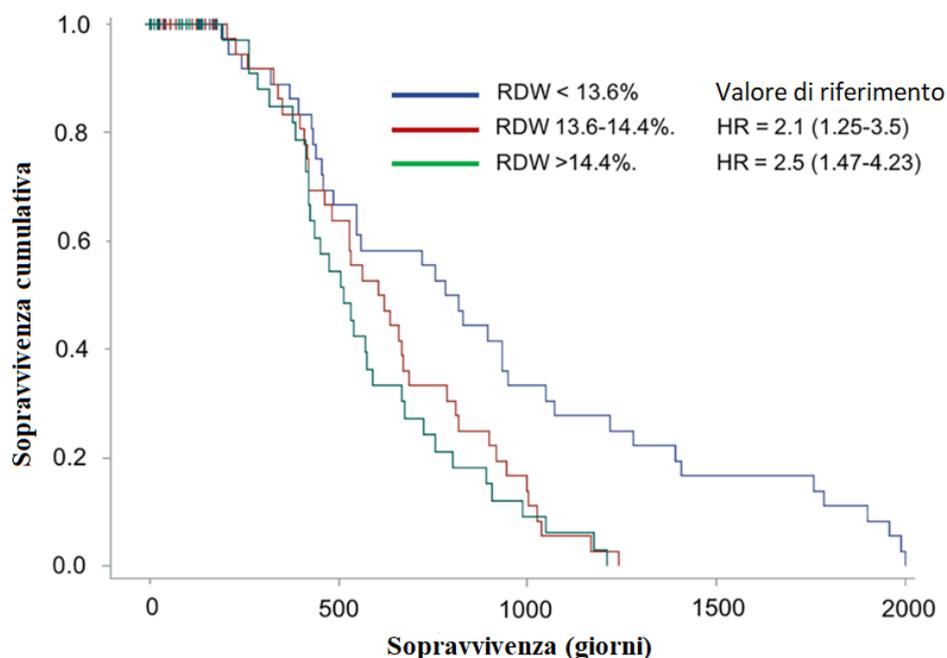
**Tabella 9.** Analisi multivariata del rischio (modello di Cox) di morte a sei mesi in cani affetti da MMVD

La **Figura 14** mostra le curve di Kaplan Meyer rappresentative dell'andamento della sopravvivenza degli animali inclusi nei tre sottogruppi in cui è stato suddiviso il

campione in base all'appartenenza al primo, al secondo o al terzo terzo di valori assunti da RDW.

Il primo terzo (RDW < 13,6%) è stato utilizzato come valore di riferimento nel confronto con gli altri due gruppi. Per ogni gruppo, l'analisi della curva ha permesso di esprimere il valore di HR accompagnato dal relativo intervallo di confidenza del 95%.

I cani con un valore di RDW appartenente al secondo (RDW = 13,6 - 14,4%) e al terzo terzo (RDW > 14,4%) presentavano un tempo di sopravvivenza significativamente più basso e un rischio di morte più elevato (HR = 2,09 e 2,5, IC 95% = 1,25 - 3,50 e 1,47 - 4,23; P = 0,005 e P <0,001, rispettivamente) rispetto ai cani con RDW <13,6% (ovvero inclusi nel primo terzo).



*Figura 14. Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier confrontano il tempo di sopravvivenza prima dell'insorgenza della morte per qualsiasi causa in 146 cani con MMVD suddivisi in base all'appartenenza al primo, al secondo o al terzo terzo di range di RDW. HR: hazard ratio*

#### 4.4. DISCUSSIONE

Lo studio in oggetto è stato il primo a valutare il significato prognostico di RDW in cani affetti da MMVD.

I risultati hanno mostrato che l'aumento di RDW è significativamente associato a un prognosi negativa nei cani con MMVD indipendentemente dall'eventuale

concomitante condizione di anemia. Ulteriori elementi predittivi di esito negativo sono la concentrazione di globuli bianchi e di urea nel sangue e il rapporto LA/Ao misurato ecocardiograficamente.

La scelta di indagare il valore prognostico di questo parametro in medicina veterinaria si basa sui numerosi risultati ottenuti in medicina umana: diversi studi attestano che RDW è un fattore predittivo forte e indipendente di aumento della morbilità e mortalità in pazienti affetti da patologie sistemiche e cardiovascolari (Salvagno et al., 2015; Danese et al., 2015; Arbel et al., 2014; Allen et al., 2010; Forhéczy et al., 2009; Al Najjar et al., 2009; Felker et al., 2007).

Ad oggi, per quanto riguarda la medicina veterinaria, alcuni studi osservazionali hanno esaminato RDW in cani con malattie cardiovascolari e altre malattie sistemiche, ma nessuno di essi ha descritto un'associazione tra RDW e sopravvivenza nel cane.

Il primo studio proposto sul valore di RDW in cani con MMVD non ha evidenziato nessuna differenza tra il valore di RDW nei cani affetti dalla patologia cardiaca, compensata o scompensata, rispetto ai cani sani (Guglielmini et al., 2013). Tuttavia, un secondo studio, più recente, ha riscontrato un valore di anisocitosi più elevato in cani affetti da patologia degenerativa mitralica rispetto al gruppo di controllo (Martinez et al., 2019).

I due studi citati differiscono notevolmente sia per il numero di cani affetti coinvolti (135 nel primo e 25 nel secondo), sia per la dimensione del gruppo di controllo (27 nel primo, 79 nel secondo). La differente consistenza dei quattro gruppi indagati dai due studi potrebbe aver condotto ad una discreta variabilità nel risultato.

Lo scopo del presente studio, tuttavia, non prevede la costituzione di un gruppo di controllo, ma indaga il valore prognostico di RDW all'interno di un gruppo composto esclusivamente da animali affetti da MMVD a diversi stadi.

Il valore prognostico del parametro non era stato osservato dalle altre due indagini.

L'analisi statistica preliminare finalizzata alla formulazione del profilo demografico del campione ha evidenziato che alcune variabili laboratoristiche (urea e WBC) ed ecocardiografiche (LA/Ao ed E-max) erano significativamente più elevate nel gruppo di cani con MMVD morti entro sei mesi dalla diagnosi rispetto ai cani con tempi di sopravvivenza più lunghi.

Le stesse variabili erano anche correlate negativamente con la sopravvivenza dopo i sei mesi; altre variabili cliniche (età, stadio ACVIM avanzato, somministrazione di trattamento cardiaco e misto), laboratoristiche (RDW) ed ecocardiografiche (LVDDn e TR Vmax) presentavano analogamente un coefficiente di correlazione negativo con la sopravvivenza.

Oltre a questo aspetto, i risultati del test correlazione di Spearman hanno mostrato che RDW era positivamente correlato con l'età, suggerendo un leggero aumento dell'anisocitosi con l'invecchiamento.

Nell'uomo, RDW tende ad aumentare parallelamente all'età (Cheng et al., 2004) e i soggetti anziani hanno valori di anisocitosi più elevati (Patel et al., 2009). In medicina veterinaria, l'indagine di questa associazione ha prodotto risultati contrastanti. Nessun aumento specifico di RDW è stato riscontrato in uno studio che ha descritto "l'anemia degli anziani" nei cani geriatrici che presentano ematocrito, volume corpuscolare medio (*mean corpuscular volume*, MCV) e ferro sierico ridotti (Radakovich et al., 2017).

Inoltre, altri studi condotti su RDW in cani con diverse malattie, non sono riusciti a dimostrare cambiamenti del livello di anisocitosi associati all'età (Guglielmini et al., 2013; Martinez et al., 2019). Tuttavia, uno studio condotto sui cani con ipertensione polmonare ha riportato una moderata correlazione positiva tra RDW ed età (Mazzotta et al., 2016).

Questi risultati contrastanti possono essere dovuti a differenze tra i diversi studi negli obiettivi e nella selezione degli animali. L'effetto dell'età su RDW merita ulteriori indagini prospettiche, in particolare quando si studiano malattie associate all'invecchiamento come MMVD.

La correlazione negativa di RDW con ematocrito, globuli rossi ed emoglobina accomuna questo studio e diversi altri sia in medicina veterinaria (Guglielmini et al., 2013; Mazzotta et al., 2016, Martinez et al., 2019; Swann et al, 2014) che in medicina umana (Allen et al., 2010; Oh et al., 2009; Tonelli et al., 2008). Questo risultato conferma l'associazione tra RDW e anemia rigenerativa: in corso di una forma anemica (calo di RBC ed ematocrito), se c'è un'attiva risposta midollare vengono immesse in circolo anche alcune forme immature dei globuli rossi come i reticolociti. La fisiologica differenza di diametro e volume tra RBC maturi e reticolociti è alla base di un aumento dell'indice di anisocitosi.

L'analisi univariata ha identificato dodici fattori predittivi di esito avverso, tra cui alcune variabili cliniche (età, trattamento con farmaci cardiologici, stadio ACVIM avanzato e presenza di FA), di laboratorio (urea, WBC e RDW) ed ecocardiografiche (LA/Ao, LVDDn, LVSDn, E-max e TR Vmax).

Molte di queste variabili, in particolare quelle ecocardiografiche, erano già state individuate in passato come predittori di prognosi sfavorevole nei cani con MMVD (Borgarelli et al., 2008; Moonarmart et al., 2010; Borgarelli et al., 2012; Hezzell et al., 2012; Borgarelli et al., 2015; Sargent et al., 2015; Jung et al., 2016; Kim et al., 2017; Baron Toaldo et al., 2018; Guglielmini et al., 2020).

Solo la concentrazione di urea, il numero totale di WBC, RDW e il rapporto LA/Ao hanno mantenuto il loro significato predittivo di esito avverso nel modello multivariato finale.

Nel presente studio, diverse variabili hanno presentato un significato statisticamente rilevante solo nell'analisi univariata e non in fase di analisi multivariata. Le differenze circa il ruolo prognostico di questi parametri possono avere diverse spiegazioni.

In primo luogo, è stata presa in considerazione come *endpoint* la mortalità per tutte le cause piuttosto che la morte esclusivamente dovuta a causa cardiaca, impiegata più comunemente in altri studi circa il valore prognostico di parametri ecocardiografici o laboratoristici in animali affetti da MMVD (Baron Toaldo et al., 2018; Sargent et al., 2015). Questa scelta si è basata sull'età avanzata dei cani con MMVD e sulla conseguente frequente associazione con altre comorbidità che influiscono sulla mortalità.

In secondo luogo, sono state riscontrate molte collinearità tra diverse variabili ecocardiografiche potenzialmente rientranti nel modello di analisi multivariata finale. Pertanto, solo il rapporto LA/Ao è stato mantenuto nel modello, analogamente ad altri studi precedenti (Borgarelli et al., 2008; Borgarelli et al., 2012, Sargent et al., 2015; Baron Toaldo et al., 2018).

Inoltre, sono state analizzate solo alcune variabili ematobiochimiche di laboratorio, e non sono stati considerati i biomarcatori cardiaci specifici (es. NT-proBNP e troponina cardiaca I) che erano stati valutati in studi precedenti su cani con MMVD (Moonarmart et al., 2010 e Hezzell et al., 2012).

Infine, la fibrillazione atriale, che aveva il più alto HR nell'analisi univariata, non è stata trattenuta nel modello multivariato finale a causa sia della collinearità con alcune variabili

ecocardiografiche (es. LA/Ao) sia della bassa prevalenza dell'aritmia nei cani con MMVD (Guglielmini et al., 2020) evidenziata anche nel campione del presente studio.

La conclusione dell'analisi multivariata evidenzia che l'urea è il più forte parametro predittivo di esito negativo (valore di *chi square* più elevato), ma il rapporto LA/Ao rimane ancora la variabile con il più alto HR, seguita da RDW.

In particolare, per ogni aumento dell'1% di RDW c'era un aumento del 20% della frequenza di morte entro sei mesi dalla misurazione nei cani utilizzati in questo studio.

Il valore predittivo negativo dell'aumento di RDW è stato ulteriormente confermato dall'analisi della curva di Kaplan Meyer che ha mostrato che i cani con RDW nel secondo e nel terzo terzile avevano più del doppio del rischio di morte rispetto a quelli con RDW nel terzile più basso.

Gli altri parametri statisticamente significativi nell'analisi multivariata hanno presentato importanza più ridotta: un aumento di un'unità di mg/dl per l'urea e di un migliaio di WBC per ml comportava un aumento rispettivamente del 1.6% e del 4.3% del rischio di prognosi infausta.

In questo studio, anche l'aumento della concentrazione ematica di globuli bianchi e di urea è associato ad un aumento del rischio di morte.

Un aumento dei leucociti era già stato segnalato in cani con malattia cardiaca e insufficienza cardiaca scompensata e probabilmente riflette uno stato infiammatorio associato a malattia cardiaca avanzata (Farabaugh et al., 2004; Domanjko Petric et al., 2018; Hamilton – Elliot et al., 2018).

Allo stesso modo, un aumento della concentrazione di urea o creatinina, o di entrambe, è stato descritto nei cani con MMVD; la prevalenza dell'iperazotemia è elevata in cani con MMVD e aumenta ulteriormente in parallelo con la gravità dell'insufficienza cardiaca congestizia (Niccolle et al., 2007; Valente et al., 2020). Recentemente, è stata riscontrata anche una correlazione significativa tra il valore dell'urea ematica e lo stadio ACVIM di appartenenza. Contestualmente, una classe ACVIM avanzata può essere predittiva di uno stadio avanzato di malattia renale cronica e viceversa (Martinelli et al., 2016). Inoltre, uno studio ha dimostrato che l'azotemia, oltre ad altre variabili cliniche (es. cachessia cardiaca) e di laboratorio, era associata a tempi di sopravvivenza più brevi nei cani con malattia cardiaca (Ineson et al., 2019).

La progressione di MMVD e l'eventuale sviluppo di CHF, a causa della diminuzione della portata cardiaca, riducono la perfusione renale e questo può esitare in un aumento del valore di urea ematica dovuto all'evoluzione di iperazotemia prerenale. Allo stesso tempo l'attivazione del sistema RAAS, l'aumento della produzione di catecolammine e gli elevati livelli di endotelina contribuiscono alla vasocostrizione renale con una riduzione della pressione di perfusione renale e un aumento del riassorbimento (Aronson et al., 2004). Gli effetti neuroendocrini sono esacerbati dalla somministrazione dei diuretici, solitamente prescritti nelle fasi più avanzate di MMVD.

Il valore prognostico negativo di RDW in cani con MMVD osservato in questo studio riflette risultati simili a quelli riportati in diversi studi condotti su pazienti umani con disturbi cardiovascolari, disturbi metabolici (diabete, malattie renali ed epatiche), condizioni acute (avvelenamento acuto, pancreatite acuta e pazienti critici) e condizioni croniche (cancro, malattia infiammatoria intestinale e malattia polmonare ostruttiva cronica) (Felker et al., 2007; Al-Najjar et al., 2009; Forhéc z et al., 2009; Allen et al., 2010; Arbel et al., 2014; Salvagno et al., 2015; Danese et al., 2015).

Sebbene ci siano prove convincenti del significato clinico di RDW in diverse patologie studiate in medicina umana, sono necessari ulteriori approfondimenti per capire se l'anisocitosi sia un vero fattore di rischio o un semplice epifenomeno di uno squilibrio metabolico o biologico sottostante (Salvagno et al., 2015). Anche se non è ancora possibile fornire una spiegazione semplice e inequivocabile delle cause e dell'effetto dell'aumento di RDW, diverse anomalie biologiche e metaboliche associate ad alcuni disturbi umani possono esercitare un effetto considerevole sull'eritropoiesi, tra queste si considerano stress ossidativo, infiammazione, cattivo stato nutrizionale, dislipidemia, frammentazione degli eritrociti, diminuzione della sintesi dell'eritropoietina e iporesponsività dell'eritropoietina. Alcune di queste anomalie sono state riportate anche in cani con malattie cardiache, inclusi quelli affetti da MMVD (Freeman et al., 2005; Reimann et al., 2017; Domanjko Petric et al., 2018; Ineson et al., 2019; Rubio et al., 2020).

Questo studio presenta diversi limiti a causa del suo disegno retrospettivo. In primo luogo, poiché sono stati inclusi solo i cani con MMVD e con esami laboratoristici disponibili, c'era un bias intrinseco nella selezione dei casi.

In seconda battuta, spesso era disponibile solo una singola valutazione di RDW e, pertanto, il parametro oggetto dell'indagine potrebbe essere cambiato nell'intervallo di tempo tra la misurazione e la morte o il follow-up. La scelta di considerare un intervallo di tempo piuttosto breve tra l'analisi di laboratorio e l'*endpoint* "morte per qualsiasi causa" consente di superare questo inconveniente.

Terzo, nell'analisi è stato considerato uno spettro limitato di variabili emato-biochimiche di laboratorio ed ecocardiografiche. La valutazione di altre variabili avrebbe potuto offrire ulteriori informazioni sul ruolo fisiopatologico di diverse anomalie potenzialmente associate all'anisocitosi.

Infine, poiché alcuni dei cani inclusi nell'indagine non sono pazienti regolari dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico dell'Università di Padova (prime visite o animali inviati a fini diagnostici che sono stati poi trattati dai veterinari di riferimento), in diversi casi, non è stato possibile valutare l'effetto della terapia medica durante il follow-up. Inoltre, l'anamnesi medica non era sempre completa e le misurazioni ecocardiografiche e laboratoristiche eseguite in una sola occasione potrebbero aver risentito di alterazioni contingenti non rilevanti ai fini dell'esame.



## 5. CONCLUSIONI

In conclusione, l'ipotesi formulata all'inizio dell'indagine è stata confermata e i risultati del presente studio hanno dimostrato che, in una popolazione di cani affetti da MMVD a diversi stadi, RDW costituisce un fattore predittivo indipendente di esito infausto dovuto a qualsiasi causa. In particolare, nel campione studiato, per ogni aumento percentuale di RDW c'è un aumento del 20% del rischio di morte.

Queste informazioni possono essere utili per i cardiologi veterinari nella scelta del trattamento e nella gestione del paziente e offrono nuove interessanti prospettive sull'uso prognostico di un parametro di laboratorio poco costoso e facilmente misurabile in ogni struttura dotata di uno strumento per le analisi del sangue.

Ad oggi, non sono ancora disponibili schemi di stratificazione del rischio sensibili e specifici relativi ai diversi stadi ACVIM in cui sono suddivisi i cani affetti da MMVD. Per questo motivo, il riscontro di un significato prognostico statisticamente rilevante di RDW potrebbe essere utile in futuro per una più precisa comprensione del livello di gravità del paziente visitato.

Altre variabili che costituiscono dei marker prognostici negativi in animali affetti da MMVD sono concentrazione ematica di urea, globuli bianchi e rapporto LA/Ao. Questo risultato sottolinea l'importanza di associare all'esame ecocardiografico tradizionale anche esami emato-biochimici periodici. In questo modo, non solo si monitora la progressione della patologia dal punto di vista del rimodellamento cardiaco, ma si tiene controllato anche il quadro generale del paziente considerando in particolar modo affezioni concomitanti ed effetti collaterali dei farmaci.

Un altro aspetto parzialmente indagato dal presente studio e sicuramente meritevole di ulteriori approfondimenti riguarda l'associazione tra RDW e invecchiamento. Sebbene i risultati ottenuti fino ad oggi non orientino verso una risposta univoca, la ricerca di un legame tra indice di anisocitosi ed età potrebbe aiutare nella comprensione del significato di questo parametro specialmente in corso di patologie legate all'età come la malattia da degenerazione mixomatosa della valvola mitralica.

Nel complesso, ulteriori studi longitudinali prospettici potrebbero superare i limiti della presente indagine e confermare i risultati preliminari ottenuti attraverso questo

studio retrospettivo offrendo una spiegazione aggiuntiva della complessa relazione tra anisocitosi ed esiti avversi nei cani con malattie cardiache e non cardiache.

La comprensione dei meccanismi fisiopatologici legati all'aumento di RDW potrebbe validare ulteriormente il significato prognostico della variabile e aiutare nell'impostazione della corretta gestione dell'animale.

# APPENDICE

## MALATTIA MIXOMATOSA DELLA VALVOLA MITRALE

Il questionario seguente punta ad indagare la condizione attuale del cane per raccogliere dati per uno studio circa la malattia mitralica e i parametri degli esami del sangue.

Le chiedo gentilmente di inserire i dati relativi agli animali che ha ora o che ha avuto in passato che hanno ricevuto diagnosi di malattia mitralica mixomatosa (MMVD).

\* Required

1. Nome del proprietario \*

---

2. Nome del cane \*

---

3. Il Suo animale è ancora con Lei \*

*Mark only one oval.*

- SI    *Skip to question 7*  
 NO    *Skip to question 4*

4. Quando è mancato il suo cane? Se possibile, segni almeno mese e anno \*

---

5. Qual è stata la causa del decesso del Suo animale (es. aggravamento della patologia cardiaca, crisi epilettiche, incidente...)? \*

---

6. Il Suo cane è deceduto spontaneamente? \*

*Mark only one oval.*

SI

NO

7. Dall'ultima visita il Suo cane ha manifestato sintomi legati alla sfera cardiaca (svenimenti, affanno improvviso, difficoltà respiratoria)? \*

*Mark only one oval.*

SI

NO

8. Se la risposta precedente è stata SI, quali sono i sintomi che ha riscontrato?

---

---

---

---

---

---

This content is neither created nor endorsed by Google.

Google Forms

*Appendice: Questionario strutturato con Google Forms® per raccogliere informazioni circa la sopravvivenza dei cani inclusi nello studio.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Allen L.A., Felker G.M, Mehra M.R. et al., Validation and potential mechanisms of red cell distribution width as a prognostic marker in heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, 2010, 16: 230 - 238
2. Al-Najjar Y., Goode K.M, Zhang J. et al., Red cell distribution width: an inexpensive and powerful prognostic marker in heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 2009, 11: 1155 - 1162
3. Arbel Y., Weitzman D., Raz R. et al., Red blood cell distribution width and the risk of cardiovascular morbidity and all-cause mortality: a population-based study. *Thrombosis and Haemostasis*, 2014, 111: 300 – 307
4. Aronson D., Mittleman M.A. e Burger A.J., Elevated blood urea nitrogen level as a predictor of mortality in patients admitted for decompensated heart failure. *The American Journal of Medicine*, 2004, 116: 466 – 473
5. Atkins, C., Bonagura J., Ettinger S. et al., Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2009, 23: 1142 – 1150.
6. Baron Toaldo M., Romito G., Guglielmini C. et al., Prognostic value of echocardiographic indices of left atrial morphology and function in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2018, 32: 914 – 921
7. Baron Toaldo M., Mazzoldi C., Romito G. et al., Echocardiographic predictors of first onset of atrial fibrillation in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2020, 34: 1787 – 1793
8. Bonagura, J.D. e Schober K.E., Can ventricular function be assessed by echocardiography in chronic canine mitral valve disease? *Journal of Small Animal Practice*, 2009, 50: 12 – 24.
9. Borgarelli, M., Zini E., D’Agnolo G. et al., Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2004, 6: 27 – 34

10. Borgarelli, M., Savarino P., Crosara S. et al., Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2008, 22: 120 – 128
11. Borgarelli M. e Haggstrom J., Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: natural history, clinical presentation and therapy, *Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 2010, 40: 651 – 663
12. Borgarelli, M., Crosara S., Lamb K. et al., Survival characteristics and prognostic variables of dogs with preclinical chronic degenerative mitral valve disease attributable to myxomatous degeneration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2012, 26: 69 – 75
13. Borgarelli, M. e Buchanan J.W. Historical review, epidemiology and natural history of degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2012, 14: 93 – 101
14. Borgarelli, M., Abbott J., Braz-Ruivo L. et al., Prevalence and prognostic importance of pulmonary hypertension in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2015, 29: 569 – 574
15. Borgarelli M. e Crosara S., Malattia cronica mitralica. In: Santilli R.A., Bussadori C. e Borgarelli M., ed: *Manuale di cardiologia del cane e del gatto*. Milano, PA: Edra, 2018, 153 – 164
16. Boswood, A., Gordon S.G., Haggstrom J. et al., Longitudinal analysis of quality of life, clinical, radiographic, echocardiographic, and laboratory variables in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease receiving pimobendan or placebo: the EPIC study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2018, 32: 72 – 85
17. Boswood, A., Gordon S.G., Haggstrom J. et al., Temporal changes in clinical and radiographic variables in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease: the EPIC study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2020, 34: 1108 – 1118
18. Buchanan J.W. e Bucheler J., Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1995, 206: 194 – 199
19. Chan I.P., Wu S.Y., Chang C.C. e Chen W.Y., Serial measurements of cardiac troponin I in heart failure secondary to canine mitral valve disease, *Veterinary Record*, 2019, 185: 343

20. Cheng, C.K., Chan J., Cembrowski G.S. e van Assendelft O.W., Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: stratification by age, sex, and race. *Laboratory Hematology*, 2004, 10: 42 – 53
21. Chetboul V., Serres F., Tissier R. et al., Association of plasma N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide concentration with mitral regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2009, 23: 984 – 994
22. Chetboul, V. e Tissier R., Echocardiographic assessment of canine degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2012, 14: 127 – 148
23. Chiavegato, D., Borgarelli M., D’Agnolo G. e Santilli R.A., Pulmonary hypertension in dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 2009, 50: 253 – 258
24. Cornell C.C., Kittleson M.D., Della Torre P. et al., Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2004, 18: 311 – 321
25. Cremer, S.E., Moesgaard S.G., Rasmussen C.E. et al., Alpha-smooth muscle actin and serotonin receptors 2A and 2B in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Research in Veterinary Science*, 2015, 100: 197 – 206
26. Culshaw G.J., French A.T., Han R.I. et al., Evaluation of innervation of the mitral valves and the effects of myxomatous degeneration in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 2010, 71: 194 – 202
27. Danese, E., Lippi G. e Montagnana M., Red blood cell distribution width and cardiovascular diseases. *Journal of Thoracic Disease*, 2015, 7: E402 - E411
28. Domanjko Petrič A., Lukman T., Verk B. e Nemeč Svete A., Systemic inflammation in dogs with advanced-stage heart failure. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2018, 60: 20.
29. Falk T., Ljungvall I., Zois N.E. et al., Cardiac Troponin-I Concentration, myocardial arteriosclerosis, and fibrosis in dogs with congestive heart failure because of myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2013, 27: 500 - 506

30. Farabaugh, A., Freeman L.M., Rush J.E. e George K.L., Lymphocyte subpopulations and hematologic variables in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2004, 18: 505 - 509
31. Felker G.M., Allen L.A., Pocock S.J. et al., Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 2007, 50: 40-47
32. Fish E.J., Hansen S.C., Spangler E.A. et al., Retrospective evaluation of serum/plasma iron, red blood cell distribution width, and nucleated red blood cells in dogs with acute trauma (2009–2015): 129 cases. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2019, 29: 521 – 527
33. Förhécz Z., Gombos T., Borgulya G. et al., Red cell distribution width in heart failure: prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state. *American Heart Journal*, 2009, 158: 659 – 666
34. Fousse S.L., Tyrell W.D., Dentino M.E. et al., Pedigree analysis of atrial fibrillation in Irish Wolfhounds supports a high heritability with a dominant mode of inheritance. *Canine Genetics and Epidemiology*, 2019, 6: 11
35. Fox P.R., Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2012, 14: 103 – 126
36. Freeman L.M., Rush J.E., Milbury P.E. e Blumberg J.B., Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with congestive heart failure, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2005, 19: 537 – 541
37. Gouni V., Serres F.J., Pouchelon J.L. et al., Quantification of mitral valve regurgitation in dogs with degenerative mitral valve disease by use of the Proximal Isovelocity Surface Area Method. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2007, 231: 399 – 406
38. Guglielmini C., Poser H., Dalla Pria A. et al., Red blood cell distribution width in dogs with chronic degenerative valvular disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2013, 243: 858 – 862
39. Guglielmini C., Goncalves Sousa M., Baron Toaldo M. et al., Prevalence and risk factors for atrial fibrillation in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2020, 34: 2223 – 2231

40. Guglielmini C., Valentini C.M., Contiero B. et al., Red Cell Distribution Width has a negative prognostic role in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Animals*, 2021, 11:778
41. Haggstrom J., Boswood A., O’Grady M. et al., Longitudinal analysis of quality of life, clinical, radiographic, echocardiographic and laboratory variables in dogs with myxomatous mitral valve disease receiving pimobendan or benazepril: the QUEST study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2013, 27: 1441 – 1451
42. Hamilton-Elliott J., Ambrose E., Christley R. e Dukes-McEwan J., White blood cell differentials in dogs with congestive heart failure (CHF) in comparison to those in dogs without cardiac disease: white blood cell differentials in dogs with CHF. *Journal of Small Animal Practice*, 2018, 59: 364 – 372
43. Han R.I., Clark C.H., Black A. et al., Morphological changes to endothelial and interstitial cells and to the extra-cellular matrix in canine myxomatous mitral valve disease (endocardiosis). *The Veterinary Journal*, 2013, 197: 388 – 394
44. Hansson K., Haggstrom J., Kvarn C e Lord P., Left to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in Cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 2002, 43: 568 – 575
45. Henry J.B., McPherson R.A. e Pincus M.R., Henry’s clinical diagnosis and management by laboratory methods, 22nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2011
46. Hezzell M.J., Boswood A., Moonarmart W, e Elliott J., Selected echocardiographic variables change more rapidly in dogs that die from myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2012, 14: 269 – 279
47. Hezzell M.J., Boswood A., Chang Y.M. et al., The combined prognostic potential of serum high-sensitivity cardiac troponin I and N-Terminal pro-B-Type Natriuretic Peptide concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2012, 26: 302 – 311
48. Hodges J. e Christopher M.M., Diagnostic accuracy of using erythrocyte indices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2011, 238: 1452 – 1458

49. Ineson D.L., Freeman L.M. e Rush J.E., Clinical and laboratory findings and survival time associated with cardiac cachexia in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2019, 33: 1902 – 1908
50. Jung S.W., Sun W., Griffiths L.G. e Kittleson M.D., Atrial fibrillation as a prognostic indicator in medium to large-sized dogs with myxomatous mitral valvular degeneration and congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2016, 30: 51 – 57
51. Keene B.W., Atkins C.E., Bonagura J.D. et al., ACVIM Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2019, 33: 1127 – 1140
52. Kellihan H.B. e Stepien R.L., Pulmonary hypertension in canine degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2012, 14: 149 – 164
53. Kim H.T., Han S.M., Song W.J. et al., Retrospective study of degenerative mitral valve disease in small-breed dogs: survival and prognostic variables. *Journal of Veterinary Science*, 2017, 18: 369
54. Kittleson M.D e Brown W.A., Regurgitant fraction measured by using the proximal isovelocity surface area method in dogs with chronic myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2003, 17: 84 – 88
55. Kwart C., Haggstrom J, Pedersen H.D. et al., Efficacy of enalapril for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic mitral regurgitation, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2002, 16: 80 – 88
56. Lamb C.R., Wikeley H., Boswood A e Pfeiffer D.U., Use of breed – specific ranges for the vertebral heart scale as and aid to the radiographic diagnosis of cardiac disease in dogs. *The Veterinary record*, 2001, 148: 707 – 711
57. Lippi G. e Plebani M., Red blood cell distribution width (RDW) and human pathology. One size fits all. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2014, 52: 1247 – 1249
58. Ljungvall I., Hoglund K., Tidholm A. et al., Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2010, 24: 153 – 159
59. Malcolm E.L., Visser L.C., Philips K.L. e Johnson L.R., Diagnostic value of vertebral left atrial size as determined from thoracic radiographs for assessment of left atrial

- size in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2018, 253: 1038 – 45
60. Markby G., Summers K.M., MacRae V.E. et al., Myxomatous degeneration of the canine mitral valve: from gross changes to molecular events. *Journal of Comparative Pathology*, 2017, 156: 371 – 383
61. Martinelli E., Locatelli C., Basis S. et al., Preliminary investigation of cardiovascular-renal disorders in dogs with chronic mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2016, 30: 1612 – 161
62. Martinez C., Mooney C.T., Shiel R.E. et al., Evaluation of red blood cell distribution width in dogs with various illnesses, *Canine Veterinary Journal*, 2019, 60: 964 - 971
63. Mazzotta E., Guglielmini C., Menciotti G. et al., Red blood cell distribution width, hematology, and serum biochemistry in dogs with echocardiographically estimated precapillary and postcapillary pulmonary arterial hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2016, 30: 1806 – 1815
64. Mikawa S., Nagakawa M., Ogi H. et al., Use of vertebral left atrial size for staging of dogs with myxomatous valve disease, *Journal of Veterinary Cardiology*, 2020, 30: 92 – 99
65. Moonarmart W., Boswood A., Luis Fuentes V. et al., N-Terminal pro B-Type Natriuretic Peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *Journal of Small Animal Practice*, 2010, 51: 84 – 96
66. Mow T. e Pedersen H.D. Increased endothelin-receptor density in myxomatous canine mitral valve leaflets. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1999, 34: 254 – 260
67. Muzzi R.A.L., de Araùjo R.B., Muzzi L.A.L. et al., Regurgitant jet area by doppler color flow mapping: quantitative assessment of mitral regurgitation severity in dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2003, 5: 33 – 38
68. Nakamura R.K., Tompkins E., Russell N.J. et al., Left atrial rupture secondary to myxomatous mitral valve disease in 11 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 2014, 50: 405 – 408
69. Neiger R., Hadley J. e Pfeiffer D.U., Differentiation of dogs with regenerative and non-regenerative anaemia on the basis of their red cell distribution width and mean corpuscular volume. *Veterinary Record*, 2002, 150: 431 – 434

70. Nicolle A.P., Chetboul V. e Allerheiligen T. et al., Azotemia and glomerular filtration rate in dogs with chronic valvular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2007, 21: 943 – 949
71. Ogawa M., Hori Y., Kanno N. et al., Comparison of N-terminal pro-atrial natriuretic peptide and three cardiac biomarkers for discriminatory ability of clinical stage in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2021, [doi: 10.1292/jvms.20-0629](https://doi.org/10.1292/jvms.20-0629). Online ahead of print.
72. Oh, J., Kang S.M., Hong N. et al., Relation between red cell distribution width with echocardiographic parameters in patients with acute heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, 2009, 15: 517 – 522
73. Olsen L.H., Fredholm M. e Pedersen H.D., Epidemiology and inheritance of mitral valve prolapse in Dachshunds, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1999, 13: 448 – 456
74. Oyama M.A., Rush J.E., Rozanski E.A. et al., Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2009, 235: 1319 – 1325
75. Oyama M.A. e Levy R.J., Insights into serotonin signaling mechanisms associated with canine degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2010, 24: 27 – 36
76. Parizadeh S.M., Jafarzadeh-Esfehani R., Bahreyni A. et al., The diagnostic and prognostic value of red cell distribution width in cardiovascular disease; current status and prospective. *Biofactors*, 2019, 45: 507 – 516
77. Patel K.V., Ferrucci L., Ershler W.B. et al., Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults. *Archives of Internal Medicine*, 2009, 169: 515
78. Patel K.V., Mohanty J.C., Kanapuru B. et al., Association of the red cell distribution width with red blood cell deformability. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2013, 765: 211 – 216
79. Peddle G.D. e Buchanan J.W., Acquired atrial septal defects secondary to rupture of the atrial septum in dogs with degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2010, 12: 129 – 134

80. Pomerance A. e Whitney J.C., Heart valve changes common to man and dog: a comparative study, *Cardiovascular Research*, 1970, 4: 61 - 66
81. Radakovich L.B., Pannone S.C., Truelove M.P. et al., Hematology and biochemistry of aging — evidence of “Anemia of the elderly” in old dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 2017, 46: 34 – 45
82. Reimann M.J., Haggstrom J., Moller J.E. et al., Markers of oxidative stress in dogs with myxomatous mitral valve disease are influenced by sex, neuter status, and serum cholesterol concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2017, 31: 295 – 302
83. Reiner C., Visser L.C., Kellihan H.B. et al., ACVIM consensus statement guidelines for the diagnosis, classification, treatment, and monitoring of pulmonary hypertension in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2020; 34: 549 – 573.
84. Roderick K.V., Abelson A.L., Nielsen L. et al, Evaluation of red blood cell distribution width as a prognostic indicator in cats with acquired heart disease, with and without congestive heart failure. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2017, 19: 648 – 656
85. Rubio C.P., Saril A., Kocaturk M. et al., Changes of inflammatory and oxidative stress biomarkers in dogs with different stages of heart failure. *BMC Veterinary Research*, 2020, 16: 433
86. Salvagno G. L., Sanchis-Gomar F., Picanza A. e Lippi G., Red blood cell distribution width: a simple parameter with multiple clinical applications. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2015, 52: 86 – 105
87. Sargent J., Muzzi R., Mukherjee R. et al., Echocardiographic predictors of survival in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2015, 17: 1 – 12
88. Saunders A.B., Gordon S. e Miller M., Canine atrial fibrillation. *Veterinary Learning System*, 2009, Compendium: continuing education for veterinarians: E1 – E10
89. Schneider P., Ernst E. e Trautwein G., Amyloidose der herzkappen beim hund. *Veterinary Pathology*. 1971, 8: 130 – 45
90. Serres F., Chetboul V., Tissier R. et al., Comparison of 3 ultrasound methods for quantifying left ventricular systolic function: correlation with disease severity and

- prognostic value in dogs with mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008, 22: 566 – 577
91. Stanzani G., Cowlam R., English K e Connolly D.J., Evaluation of red blood cell distribution width in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2015, 17: S233 – 43
  92. Stepien R.L., Rak M.B. e Blume L.M., Use of radiographic measurements to diagnose stage B2 preclinical myxomatous mitral valve disease in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2020, 256: 1129 – 1136
  93. Swann J.W., Sudunagunta S., Covey H.L. et al., Evaluation of red cell distribution width in dogs with pulmonary hypertension. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2014, 16: 227 – 235
  94. Swenson L., Haggstrom J., Kwart C. e Juneja R.K., Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1996, 208: 2009 – 2012
  95. Tarnow I., Olsen L.H., Kwart C. et al., Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *The Veterinary Journal*, 2009, 180: 195 – 201
  96. Terzo E., Di Marcello M., McAllister H et al., Echocardiographic assesment of 537 dogs with mitral valve prolapse and leaflet involvement. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 2010, 50: 416 – 422
  97. Tonelli M., Sacks F., Arnold M. et al., Relation between red blood cell distribution width and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation*, 2008, 117: 163 – 168
  98. Tziakas D., Chalikias G., Grapsa A. et al., Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2012, 51: 243 – 254
  99. Valente C., Guglielmini C., Domenech O. et al., Symmetric Dimethylarginine in dogs with myxomatous mitral valve disease at various stages of disease severity. *PLOS ONE*, 2020, 15: e0238440