



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

**Facoltà di Medicina Veterinaria**

**Dipartimento di Salute Animale**

**Dottorato di Ricerca in Salute Animale**

**I MEDIATORI DELL'INFIAMMAZIONE IN CORSO DI  
INSUFFICIENZA CARDIACA SECONDARIA A ENDOCARDIOSI  
MITRALICA ED INSUFFICIENZA VALVOLARE NEL CANE**

**Coordinatore: Prof. Sandro Cvirani**

**Tutor: Prof.ssa Cecilia Quintavalla**

**Dottorando:**

**Dott.ssa Antonia Mavropoulou**

**Dottorato di Ricerca XXIV Ciclo - AA 2009-2011**

## INDICE

	Pagina
Abstract .....	4
1-STATO DELL'ARTE .....	6
• Endocardiosi mitralica del cane .....	7
○ Eziologia .....	8
○ Anatomia e istologia della valvola mitrale .....	9
○ Fisiopatologia dell'insufficienza cardiaca .....	12
○ Sintomatologia ed esame clinico.....	15
○ Strumenti diagnostici .....	16
○ Trattamento .....	17
• Attivazione neuro-ormonale e immunitaria in corso di insufficienza cardiaca .....	18
○ Relazione tra citochine infiammatorie e insufficienza cardiaca .....	20
2- CONTRIBUTO SPERIMENTALE .....	30
• Scopo degli studi .....	31
• Studio 1 .....	33
○ Materiali e metodi .....	33
○ Risultati .....	42
○ Discussione .....	48
○ Conclusioni .....	52
• Studio 2 .....	53
○ Materiali e metodi .....	53
○ Risultati .....	66
○ Discussione .....	82
○ Conclusioni .....	87
3 – BIBLIOGRAFIA.....	88

**ABSTRACT** Cytokines, such as interleukins, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) form a vast class of relatively low molecular weight, pharmacologically active proteins released by a wide variety of cell types that are used in cellular communication. In response to injury, macrophages, leukocytes and endothelial cells release high concentrations of pro-inflammatory cytokines. In human patients with chronic heart failure, increased production and high plasma concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-8, TGF- $\beta$  have been associated with disease progression and a negative prognosis. Only a few reports have been published concerning cytokines in naturally occurring heart disease in veterinary medicine.

The aim of this study was to determine whether differences on cytokines levels exist in dogs with different stages of chronic valvular disease and to detect if cytokines levels correlate to echocardiographic parameters of cardiac remodeling. For this reason, initially TNF- $\alpha$  and IL-6 serum concentrations were measured by ELISA test in healthy dogs and in dogs with chronic valvular disease (CVD) in different stages of heart disease and failure. Subsequently the expression of several cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) in peripheral blood mononuclear cells of dogs with CVD was evaluated using RT-PCR (reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction).

Dogs with CVD and clinically normal dogs referred to the Veterinary Teaching Hospital of Parma University were enrolled in the study following owners' consent. All dogs were considered free of other diseases that could be associated with chronic inflammation and, consequently, high cytokine concentrations (e.g., infection, neoplasia and chronic hepatic or renal disease) on the basis of history, physical examination and a complete laboratory diagnostic work-up. Dogs affected by CVD were allocated to four groups on the basis of physical examination, radiographic examination and echocardiography according to the modified New York Heart Association (NYHA) and American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) classification.

In several samples TNF- $\alpha$  and IL-6 did not reach detectable concentrations in blood at any time-point. Some individual high responses were obtained, but no significant differences between groups were detected. Thus, levels of circulating

cytokines as measured by ELISA, are not indicative the severity of the heart failure in the examined dogs.

Dogs with CVD had significantly higher IL-8 and TGF- $\beta$  gene expression compared to clinically normal dogs. IL-8 expression increased with increased stage of heart failure while TGF- $\beta$  expression was higher in asymptomatic dogs with echocardiographic signs of cardiac remodeling. There were no statistically significant differences in the expression of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  between dogs with CVD and clinically normal dogs.

These findings suggest some pro-inflammatory cytokine involvement in the pathogenesis and the progression of mitral valve disease and in the cardiac remodeling mechanisms.

# **1 - STATO DELL'ARTE**

## ENDOCARDIOSI MITRALICA NEL CANE

L'endocardiosi mitralica, nota anche come degenerazione mixomatosa valvolare o malattia valvolare mitralica, è la patologia cardiaca acquisita più frequente nel cane e colpisce prevalentemente i soggetti anziani, con più del 75% dei cani affetti di età superiore ai 16 anni (Olsen et al., 2010). E' poco frequente in cani di età inferiore a 5 anni, con l'eccezione dei cani di razza Cavalier King Charles Spaniel nei quali l'insufficienza mitralica viene diagnosticata in circa il 10% dei cani con età inferiore a 1 anno (Kittleson & Kienle, 1998). La patologia può interessare tutte le razze ma la sua prevalenza varia notevolmente. I cani appartenenti alle razze di piccola e media taglia, come Barboni nani, Bassotti, Cavalier King Charles Spaniel e Chihuahua, sono maggiormente colpiti (Olsen et al., 2010).

L'endocardiosi mitralica è una patologia a progressione lenta caratterizzata dalla degenerazione dell'apparato valvolare che esita nella mancata coaptazione dei lembi valvolari e di conseguenza nell'insufficienza valvolare (Pedersen et al., 1996; Borgarelli et al., 2008; Olsen et al., 2010). Generalmente la patologia evolve dalla forma lieve alla forma grave nell'arco di diversi anni e non tutti i cani affetti necessitano di terapia cardiologica (Olsen et al., 2010).

Negli ultimi anni, lo studio dell'endocardiosi mitralica ha portato all'individuazione dei fattori di rischio per l'evoluzione della patologia. Questi sono rappresentati dall'età, dal sesso, dalla razza, dalla gravità delle lesioni valvolari, dalla dilatazione dell'atrio sinistro, dalla frequenza cardiaca, dalla presenza di aritmie e dalla comparsa di sincopi (Olsen et al., 2010). Un'età superiore a 8 anni al momento della diagnosi, il sesso maschile, alcune razze come il Cavalier King Charles Spaniel e il Bassotto Tedesco, la presenza di dilatazione atriale sinistra, il coinvolgimento di entrambi i lembi valvolari dal processo degenerativo, una frequenza cardiaca di base elevata, la presenza di aritmie quali fibrillazione atriale o tachicardie sopraventricolari e la presenza di sincopi sono stati correlati a tempi di sopravvivenza ridotti (Borgarelli et al., 2008).

## Eziologia

L'eziologia dell'endocardiosi valvolare mitralica non è stata ancora accertata anche se si sospetta una predisposizione genetica. Da studi effettuati su famiglie di Cavalier King Charles Spaniel e Bassotti Tedeschi sembra che la malattia presenti un'ereditarietà poligenica (Olsen et al., 2010). Il fatto che le stesse alterazioni evidenziate a livello valvolare nei cani affetti dalla patologia, si riscontrano anche in uomini affetti da patologie del collagene (per esempio da sindrome Marfan, sindrome Ehlers-Danlos e osteogenesi imperfecta) suggerisce che alla base delle lesioni degenerative potrebbe esserci un'anomalia del collagene (Kittleson & Kienle, 1998; Pedersen & Häggström, 2000).

Un'altra ipotesi propone il coinvolgimento delle cellule interstiziali valvolari nella patogenesi della patologia. Le cellule interstiziali valvolari, normalmente, hanno la funzione di regolare il turnover della matrice extracellulare attraverso la secrezione della stessa e di enzimi catabolici (per esempio metalloproteinasi di matrice -MMP) (Rabkin et al., 2001; Disatian, 2010). Uno squilibrio di questo turnover della matrice extracellulare a causa di alterazioni delle proprietà delle cellule interstiziali potrebbe essere una delle cause di degenerazione mixomatosa (Disatian, 2010). Uno studio ha messo in evidenza che le cellule interstiziali valvolari di cani affetti da degenerazione mixomatosa mitralica subiscono trasformazioni fenotipiche che correlano fortemente con lo stadio e la progressione della patologia (Disatian et al., 2008). Il ruolo di queste cellule nel processo degenerativo non è ancora chiaro ma molti ricercatori ipotizzano che potrebbero agire da attivatori della degenerazione (Disatian, 2010).

Un'altra ipotesi vede il coinvolgimento della serotonina nella patogenesi della malattia mitralica. In medicina umana, diverse condizioni che aumentano i livelli circolanti di serotonina sono state correlate con lo sviluppo di lesioni degenerative valvolari (Rajamannan et al., 2001; Disatian, 2010). In medicina veterinaria è stato dimostrato che i cani affetti dalla patologia mitralica presentano concentrazioni elevate di serotonina e l'upregolazione delle sue proteine di segnalazione, fatti che suggeriscono che potrebbe esistere un'associazione tra il sistema di segnalazione della serotonina e la patogenesi della malattia (Oyama & Chittur, 2006; Arndt et al., 2009; Disatian, 2010; Oyama & Levy, 2010).

Infine, un'altra ipotesi coinvolge il fattore di crescita trasformante beta (Transforming growth factor - TGF  $\beta$ ) nella patogenesi della malattia degenerativa mitralica per la stretta relazione che esiste tra i sistemi di segnalazione del TGF- $\beta$  e la serotonina (Disatian, 2010). Infatti, è stato dimostrato che i cani affetti dalla patologia presentano un'elevata espressione delle proteine e del mRNA del TGF $\beta$  a livello valvolare rispetto ai soggetti sani (Oyama & Chittur, 2006; Disatian et al., 2008; Aupperle et al., 2008; Disatian, 2010).

Per quanto riguarda, invece, la patogenesi del carattere progressivo della patologia, una teoria che spesso viene proposta è che si tratti di una risposta ai ripetuti traumi e allo stress meccanico ai quali è sottoposta la valvola (Pedersen & Häggström, 2000; Disatian, 2010). Secondo questa teoria, uno o più fattori primari (come per esempio anomalie del collagene o altre alterazioni della matrice extracellulare) possono causare un movimento valvolare anomalo, prolasso e di conseguenza rigurgito. Il prolasso aumenta lo stress meccanico al quale è sottoposta la valvola mentre il rigurgito è responsabile delle lesioni traumatiche. Si pensa che questi ripetuti traumi possano influenzare la sintesi e il rilascio di sostanze vasoattive (come ad esempio l'endotelina), che potrebbero indurre le alterazioni mixomatose (Mow & Pedersen, 1999; Disatian, 2010). A questo proposito, è stata messa in evidenza una forte correlazione tra il numero di recettori dell'endotelina nei lembi mitralici di cani affetti e la gravità della patologia suggerendo un coinvolgimento dell'endotelina nella patogenesi della malattia (Pedersen & Häggström, 2000; Mow & Pedersen, 1999).

#### Anatomia e istologia della valvola mitrale

L'apparato valvolare è costituito dai lembi mitralici (lembo settale o anteriore e lembo caudale o posteriore), dall'annulus valvolare fibroso, dalle corde tendinee e dai muscoli papillari ventricolari. In soggetti normali, i lembi valvolari sono strutture sottili che si inseriscono sull'anello fibroso valvolare e che si collegano ai muscoli papillari del ventricolo sinistro tramite le corde tendinee (Abbott, 2008).

Istologicamente, la valvola normale presenta quattro strati. Le superfici atriale e ventricolare sono costituiti da endocardio che è formato da cellule endoteliali le quali rivestono uno strato sottile di fibre collagene, di fibre elastiche e di



fibroblasti. Lo strato atriale presenta anche uno strato sottile di fibre muscolari lisce. Tra queste due superfici sono disposti gli strati spongioso e fibroso. La fibrosa rappresenta la porzione principale della valvola e si estende sotto l'endocardio ventricolare. E' costituita da fibre collagene densamente disposte e ben organizzate. La spongiosa è situata tra la fibrosa e l'endocardio atriale. Si tratta di uno strato sottile costituito da fibre collagene, fibroblasti e fibre elastiche lassamente distribuiti in un substrato ricco di mucopolisaccaridi, prevalentemente acido ialuronico e condroitinsolfato. Le corde tendinee sono corde di tessuto fibroso. Istologicamente sono costituite prevalentemente da un nucleo di collagene che continua con lo strato fibroso della valvola (Kittleson & Kienle, 1998).

Le modificazioni degenerative possono interessare entrambe le valvole atrioventricolari. Solitamente, nel 60% dei casi, le alterazioni riguardano solo la mitrale mentre nel 30% dei casi le lesioni si sviluppano in entrambi gli apparati valvolari. Solo una piccola percentuale, il 10%, presenta l'alterazione solo della tricuspide (Kittleson & Kienle, 1998).

Macroscopicamente, in corso di endocardiosi mitralica, l'aspetto valvolare varia a seconda dello stadio della patologia. Nelle prime fasi le alterazioni sono lievi. Solitamente si osserva l'allungamento delle corde tendinee e dei lembi valvolari e la formazione di piccoli noduli a livello di margine libero. Inizialmente le lesioni nodulari sono più marcate nel punto dove si inseriscono le corde tendinee e causano il prolasso della valvola verso l'atrio. Con la progressione della patologia questi noduli aumentano di numero e di dimensioni e diventano confluenti. Nelle fasi più avanzate, il prolasso valvolare peggiora, i margini dei lembi si ispessiscono ulteriormente e le lesioni si sviluppano anche in altri settori dell'apparato valvolare. Eventualmente le corde tendinee possono essere coinvolte dal processo patologico ed essere soggette a rottura. Queste alterazioni causano l'impedimento della coaptazione dei lembi e la valvola diventa incompetente (Abbott, 2008; Olsen et al., 2010).

Per la classificazione della progressione delle lesioni valvolari si utilizza lo schema proposto da Whitney e successivamente modificato da Kogure (Whitney, 1967; Kogure 1980; Kittleson & Kienle, 1998) che prevede la loro distinzione in tre classi. Nella classe I, le lesioni sono caratterizzate da distinti e piccoli noduli

che si formano lungo il margine valvolare e che possono confluire verso l'estremità aumentando di dimensioni. Nella classe II, il margine libero dei lembi appare ispessito e irregolare. L'ispessimento peggiora con la progressione della patologia e coinvolge anche le corde tendinee nel punto dove si inseriscono alla valvola. In classe III, la valvola presenta marcato ispessimento che si estende nei casi più gravi fino alla base dei lembi, con abbondante tessuto eccedente che prolassa nell'atrio. In questo stadio, le corde tendinee si presentano ispessite e si possono rompere causando il movimento esagerato della valvola noto anche con il nome "flail leaflet" (Kogure, 1980; Kittleson & Kienle, 1998).

Oltre alla degenerazione valvolare e delle corde tendinee, altre modificazioni che si riscontrano in sede anatomo-patologica sono legate alle alterazioni secondarie causate dal rigurgito valvolare quali dilatazione dell'atrio sinistro, dell'annulus valvolare e del ventricolo sinistro (ipertrofia eccentrica), lesioni fibrose endocardiche nell'atrio sinistro conseguenti all'impatto con il rigurgito (jet lesions) e, nei casi più gravi, vari gradi di rottura dell'endocardio atriale (Olsen et al., 2010). La rottura a tutto spessore della parete atriale provoca emopericardio e tamponamento cardiaco mentre la rottura endomiocardica a tutto spessore può coinvolgere il setto interatriale causando un difetto interatriale acquisito. Infine, spesso si evidenziano lesioni arterosclerotiche coronariche alle quali è stata attribuita la disfunzione miocardica osservata in alcuni casi nel corso della patologia (Kittleson & Kienle, 1998; Falk et al., 2006).

Microscopicamente, le prime alterazioni osservate avvengono lungo la superficie atriale della valvola. L'endotelio prolifera e c'è un aumento del numero di fibroblasti subendoteliali. Le fibre elastiche tra l'endotelio atriale e la fascia spongiosa si separano. Successivamente la spongiosa aumenta marcatamente di spessore mentre la fibrosa subisce processi degenerativi. Nel corso della malattia, a carico della spongiosa si evidenzia un marcato aumento della matrice extracellulare, ricca di acido ialuronico e condroitin solfato, in assenza di un significativo aumento delle fibre collagene o elastiche, e si osserva la proliferazione di fibroblasti che conduce alla formazione di piccoli noduli. Nella fibrosa, i fasci di collagene aumentano di volume, subiscono ialinizzazione e frammentazione e degenerano (Kittleson & Kienle, 1998). Le cellule interstiziali nelle aree affette spesso presentano alterazioni morfologiche del nucleo, dei

mitocondri e del reticolo endoplasmatico, disorganizzazione del citoscheletro e mancanza di vescicole secretorie. Le cellule endoteliali diventano polimorfe e possono mancare in molte aree affette con conseguente esposizione dello stroma extracellulare. Sono, invece, assenti gli infiltrati infiammatori (Abbott, 2008; Olsen et al., 2010). Alterazioni simili si osservano a carico delle corde tendinee (Kittleson & Kienle, 1998).

### Fisiopatologia dell'insufficienza cardiaca

La chiusura della valvola è un processo passivo che avviene in protosistole. Quando la pressione ventricolare sinistra supera la pressione atriale, i lembi della valvola sono forzati in giustapposizione e l'effetto limitante delle corde tendinee ne impedisce il prolasso nell'atrio sinistro. La coaptazione dei lembi mitralici in un soggetto normale è completa e attraverso l'orifizio valvolare non si verifica alcun rigurgito, se non di lieve entità (Abbott, 2008).

Perché la chiusura della valvola mitrale sia completa, è necessaria l'integrità anatomica e funzionale dell'apparato valvolare (Olsen et al., 2010) che può diventare insufficiente a causa di alterazioni dei lembi, di dilatazione dell'annulus, di rottura delle corde tendinee e di un'anomala contrazione dei muscoli papillari. In corso di endocardiosi mitralica più di uno di questi fattori può essere presente (Olsen et al., 2010). La valvola mitrale normale assicura che l'intera gittata del ventricolo sinistro sia espulsa attraverso l'aorta mentre la sua chiusura anomala permette a una parte della volume ventricolare di passare, attraverso l'orifizio rigurgitante, nell'atrio (Abbott, 2008).

Le conseguenze dell'insufficienza mitralica dipendono dal grado di riduzione della gittata cardiaca, dal volume rigurgitante, dalle dimensioni e dalla compliance dell'atrio sinistro e del letto vascolare polmonare e dalla comparsa di tachiaritmie (Olsen et al., 2010).

Un rigurgito mitralico di lieve entità non induce variazioni apparenti agli indici di funzionalità miocardica o dei volumi cardiaci. La portata è conservata e il piccolo volume rigurgitante è facilmente accolto dall'atrio sinistro. Con la progressione delle lesioni valvolari, il volume rigurgitante aumenta ma diversi meccanismi compensatori cardiaci e non cardiaci (es. renali, neurormonali e vascolari) contribuiscono al mantenimento della portata cardiaca (Olsen et al.,

2010; Sisson, 2010). La riduzione del flusso ematico che viene immesso nella circolazione sistemica induce un abbassamento della pressione arteriosa sistemica e una riduzione del flusso ematico renale. I barocettori rispondono all'abbassamento di pressione attivando il sistema nervoso simpatico che agisce aumentando il ritmo di scarica del nodo del seno, aumentando la contrattilità (attraverso l'attivazione dei recettori  $\beta_1$  del miocardio) e causando la costrizione delle arteriole sistemiche. L'incremento della frequenza cardiaca e della contrattilità aumentano la portata cardiaca, contribuiscono a migliorare la perfusione tissutale e, in combinazione con la costrizione arteriolare, ad aumentare la pressione ematica. L'attivazione del sistema simpatico rappresenta un meccanismo compensatorio precoce che viene attivato dall'organismo e permette, in un primo momento, la normalizzazione delle alterazioni emodinamiche (Kittleson & Kienle, 1998). Tuttavia, i recettori  $\beta_1$  vanno rapidamente incontro a down-regulation e precocemente gran parte di loro non è più in grado di essere stimolata. Di conseguenza, la portata cardiaca subisce un'ulteriore riduzione e a questo punto l'organismo deve mettere in atto altri sistemi nel tentativo di aumentarla e riportarla a livelli normali. L'ipertrofia eccentrica del ventricolo sinistro è il meccanismo compensatorio principale. La riduzione della gittata e della pressione ematica stimola i reni a produrre ormoni e aumentare la ritenzione di acqua e sodio. L'aumento del volume ematico e di conseguenza del ritorno venoso al cuore causa l'incremento di dimensioni del ventricolo sinistro e del volume telediastolico (precarico) (Kittleson & Kienle, 1998). Solitamente, la contrattilità miocardica, in corso di endocardiosi mitralica, è conservata e il volume telesistolico del ventricolo sinistro rimane nei limiti di normalità permettendo di mantenere la gittata cardiaca a livelli normali. Nel frattempo l'atrio sinistro aumenta di dimensioni (va incontro a ipertrofia eccentrica) per accogliere il sangue rigurgitante. In questo modo si evita l'aumento della pressione atriale che si ripercuoterebbe sui vasi venosi polmonari e darebbe origine a edema polmonare. Con la progressione della patologia, il ventricolo raggiunge i suoi livelli massimi di distensione mentre i meccanismi di ritenzione di acqua e sodio, attuati dall'organismo, persistono. Di conseguenza, la pressione diastolica ventricolare aumenta e il sangue viene forzato in una camera che non riesce più a dilatarsi. Questo innalzamento della pressione si ripercuote

sull'atrio sinistro che subisce, quindi, l'incremento della sua pressione diastolica mentre il passaggio del sangue rigurgitante nell'atrio durante la sistole, provoca anche l'aumento della pressione sistolica. L'innalzamento delle pressioni atriali si ripercuote sui capillari polmonari con conseguente trasudazione di liquido nel tessuto polmonare e la formazione di edema (Kittleson & Kienle, 1998).

Gli effetti del volume rigurgitante, a livello di pressione atriale sinistra e capillare polmonare, dipendono dalle dimensioni dell'atrio sinistro e della compliance delle pareti atriali. La compliance atriale è determinata dalla velocità con la quale aumenta il volume rigurgitante, la quale è condizionata dalla velocità di progressione della patologia mitralica, e dal rimodellamento atriale come risposta al sovraccarico di volume. Nel caso di progressione lenta dell'endocardiosi, si ha spesso l'ingrandimento graduale dell'atrio sinistro che evita l'innalzamento acuto e grave della pressione nei capillari polmonari. In questi casi la congestione venosa e l'edema polmonare si sviluppano più tardivamente nel corso della patologia. In caso, invece, di aumento acuto del volume rigurgitante, come per esempio a causa della rottura di una corda tendinea, l'atrio sinistro subisce un grave aumento della pressione che si ripercuote sui capillari polmonari e causa la formazione di edema acuto (Olsen et al., 2010).

Nonostante la contrattilità sia conservata nelle prime fasi della patologia, a causa del sovraccarico cronico di volume e del fatto che l'ipertrofia è un rimodellamento patologico, la funzione sistolica si riduce progressivamente e inesorabilmente anche in pazienti clinicamente compensati (Olsen et al., 2010).

Infine, casi avanzati di endocardiosi mitralica possono essere complicati da situazioni che sono correlati all'aumento della pressione e delle dimensioni dell'atrio sinistro. La rottura dell'atrio può causare tamponamento cardiaco acuto; la presenza di insufficienza tricuspide e/o ipertensione arteriosa polmonare possono condurre a insufficienza cardiaca destra; e, infine, le alterazioni miocardiche possono dare origine a tachiaritmie (Olsen et al., 2010).

### Sintomatologia ed esame clinico

Molti cani affetti da malattia degenerativa mitralica rimangono asintomatici per lunghi periodi di tempo e in questi casi il soffio cardiaco è un reperto accidentale. I soggetti che invece vanno incontro a insufficienza cardiaca secondaria a endocardiosi mitralica, presentano i segni clinici di insufficienza congestizia sinistra come intolleranza all'esercizio fisico, tosse, dispnea e sincope. La tosse è un sintomo comune ed è causata dalla compressione del bronco principale di sinistra dall'atrio dilatato, dall'edema polmonare o più spesso ad una combinazione di queste due condizioni. La tosse legata alla compressione del bronco viene descritta come forte e secca e diventa più evidente nelle ore notturne e in seguito ad esercizio fisico o agitazione. Invece, i cani con edema polmonare spesso presentano tachipnea, dispnea e ortopnea. Le sincope sono associate a insufficiente flusso anterogrado, ipertensione polmonare e/o aritmie cardiache (Abbott, 2008; Olsen et al., 2010; Disatian, 2010).

All'auscultazione cardiaca, negli stadi precoci della malattia, si riscontra frequentemente un click mesosistolico accompagnato da un soffio di lieve entità udibile solo nelle fasi iniziali della sistole (protosistolico) a livello di apice cardiaco. Con l'avanzare della patologia il soffio diventa olosistolico e più intenso, si può irradiare nell'emitorace destro e può essere accompagnato da un fremito palpabile a livello di area apicale cardiaca (Ware, 2007; Abbott, 2008; Olsen et al., 2010). L'auscultazione polmonare risulta normale, in pazienti che non presentano segni clinici di insufficienza cardiaca. In corso di edema polmonare si sviluppano crepitii e rumori respiratori aspri inizialmente meglio udibili a fine inspirazione. Con la progressione del quadro di edema i rumori polmonari aumentano di intensità e diventano udibili durante tutta la durata dell'inspirazione e l'espiazione (Ware, 2007; Olsen et al., 2010).

I polsi arteriosi femorali sono solitamente normali nelle fasi precoci della malattia e possono diventare deboli o presentare deficit nel caso di riduzione del flusso ematico anterogrado e di comparsa di alterazioni del ritmo cardiaco (Olsen et al., 2010).

Ascite, epatomegalia e splenomegalia possono essere presenti in pazienti affetti da patologia mitralica avanzata complicata da ipertensione polmonare, tachiaritmie e versamento pericardico (Olsen et al., 2010).

### Strumenti diagnostici

La radiografia toracica rappresenta uno degli esami diagnostici più utili. Permette di evidenziare l'ingrandimento atriale e ventricolare sinistro, la congestione delle vene polmonari e la presenza di edema polmonare. In casi di insufficienza mitralica avanzata, la presenza di versamento pleurico, ingrandimento della vena cava caudale, ascite, epatomegalia e splenomegalia accompagnano l'insufficienza cardiaca destra (Olsen et al., 2010). I riscontri elettrocardiografici sono spesso aspecifici. Il prolungamento dell'onda P (P mitrale) e del complesso QRS possono accompagnare l'ingrandimento atriale e ventricolare sinistro. I battiti prematuri sopraventricolari, episodi di tachicardia sopraventricolare, la fibrillazione atriale e i battiti prematuri ventricolari sono alcune delle aritmie che possono essere riscontrate in pazienti affetti da patologia degenerativa mitralica (Olsen et al., 2010).

L'ecocardiografia è l'esame di elezione per la valutazione della morfologia valvolare e, attraverso l'utilizzo di diversi parametri quantitativi e semi-quantitativi, permette la stadiazione della patologia. Lo studio bidimensionale (B-mode) e monodimensionale (M-mode) sono utilizzati per definire la morfologia e il tipo di lesione, la presenza di prolasso valvolare o di corde tendinee rotte (Boon, 2011) mentre attraverso la misurazione delle dimensioni e dei parametri funzionali delle camere cardiache si definisce sia la cronicità della patologia che il grado di rimodellamento. Il Doppler a codifica di colore (Color Doppler) identifica rapidamente la presenza di rigurgito e attraverso la valutazione dell'estensione del jet rigurgitante nella camera atriale, della larghezza del jet a livello dell'orifizio rigurgitante e dell'area di convergenza del flusso si può avere una stima accurata del volume rigurgitante. Il Doppler a onda continua e pulsata determina la gravità emodinamica dell'insufficienza attraverso la valutazione della velocità e del profilo dei flussi (Tezo et al., 2009; Boon, 2011).

### Trattamento

Allo stato attuale, non esiste una terapia farmacologica in grado di prevenire o rallentare la degenerazione valvolare e il trattamento chirurgico, per la correzione

o la sostituzione della valvola, in campo veterinario, solitamente non è fattibile per motivi tecnici, economici ed etici (Ettinger, 2010; Olsen et al., 2010). La gestione farmacologica della malattia mitralica ha lo scopo di migliorare la qualità della vita, controllando i segni clinici e prolungando i tempi di sopravvivenza (Ettinger, 2010; Olsen et al., 2010).

L'impiego di una terapia cardiologica in pazienti asintomatici affetti da endocardiosi mitralica rimane controverso. Studi in campo umano hanno ipotizzato che il trattamento precoce con ACE inibitori sia in grado di rallentare l'insorgenza dell'insufficienza cardiaca (Disatian, 2010, SOLVD study). In campo veterinario, per lo stesso motivo i farmaci ACE-inibitori sono stati utilizzati, in passato, come terapia cardioprotettiva in pazienti asintomatici affetti da patologia mitralica lieve, in modo da posticipare o prevenire la comparsa dell'insufficienza cardiaca congestizia. Tuttavia, i risultati dei vari studi prospettici in medicina veterinaria (SVEP, VETPROOF) non hanno fornito risultati statisticamente significativi che dimostrino che l'impiego di un ACE-inibitore in monoterapia sia in grado di influenzare il momento di insorgenza dei segni congestizi (Kvart, 2002, Atkins et al., 2007; Abbott, 2008). Solo uno studio retrospettivo ha ipotizzato che gli ACE-inibitori potrebbero avere un effetto benefico, sia in termini di ridotto rischio di morte che di prolungamento del periodo asintomatico (Pouchelon et al., 2008; Disatian, 2010;).

Nei pazienti con segni clinici attribuibili a insufficienza congestizia, lo scopo della terapia farmacologica è quello di ridurre la pressione venosa e i segni di congestione, mantenere una portata cardiaca adeguata, in modo da prevenire i segni clinici quali debolezza, letargia e facile affaticabilità, ridurre il volume rigurgitante e proteggere il cuore dagli effetti negativi a lungo termine dell'attivazione neuroormonale. A questo scopo, la terapia è prescritta a misura di paziente e spesso richiede l'utilizzo di più di un farmaco. Si usano farmaci diuretici, vasodilatatori, inotropi positivi e ACE-inibitori (Ettinger, 2010; Olsen et al., 2010; Abbott, 2008).



## **ATTIVAZIONE NEURO-ORMONALE E IMMUNITARIA IN CORSO DI INSUFFICIENZA CARDIACA**

L'insufficienza cardiaca cronica è una sindrome complessa caratterizzata da segni clinici legati alla ridotta perfusione tissutale, alla ritenzione idrica e all'azione neuro-ormonale. L'eccessiva attivazione di diversi sistemi neuro-ormonali e l'"iperproduzione" di molecole biologicamente attive (come norepinefrina, angiotensina II, aldosterone, endotelina-1) e di citochine pro-infiammatorie, sono importanti parametri fisiopatologici che contribuiscono alla progressione dell'insufficienza cardiaca (Parissis et al., 2002).

Diversi studi in campo umano hanno messo in evidenza che l'insufficienza cardiaca cronica è caratterizzata da una risposta infiammatoria prolungata che è correlata con la gravità della malattia e la prognosi. La relazione tra insufficienza cardiaca e infiammazione è stata ufficialmente riconosciuta nel 1990 quando Levine e collaboratori hanno messo in evidenza che i livelli di una citochina, il TNF-a, erano elevati in corso di insufficienza cardiaca (Levine et al., 1990). Da questa prima pubblicazione, diversi studi hanno dimostrato che oltre al TNF-a, anche altre citochine pro-infiammatorie e chemochine sono coinvolte nella progressione dell'insufficienza cardiaca (Levine et al., 1990; Bozkurt et al., 2010).

Le citochine sono proteine a basso peso molecolare (generalmente 15-30 KDa), farmacologicamente attive, che vengono secrete da diversi tipi cellulari con lo scopo di alterare la loro stessa funzione (autocrina) o quella delle cellule adiacenti (paracrina) (Nathan & Sporn, 1991; Anker & von Haeling, 2004; Bozkurt et al., 2010). Fino ad ora sono state identificate due grandi classi di citochine che si attivano in corso di insufficienza cardiaca: citochine vasocostrittrici, come l'endotelina; e citochine pro-infiammatorie, come il TNF-a, l'IL-6 e l'IL-1 (Mann, 2002; Bozkurt et al., 2010). A oggi è noto che questi mediatori dell'infiammazione sono espressi da tutte le cellule nucleate del miocardio, inclusi i miocardiociti, situazione che suggerisce che queste molecole possono fare molto di più che innescare una risposta infiammatoria nel cuore (Torre- Amione et al., 1995; Bozkurt et al., 2010). In medicina umana, diversi studi confermano che i livelli circolanti e intracardiaci di queste citochine sono elevati in pazienti con insufficienza cardiaca (Levine et al., 1990; Dutka et a., 1993; Katz et al., 1994;

Matsumori et al., 1994; Torre- Amione et al., 1996; Mann, 2002; Bozkurt et al., 2010) e che le citochine che sono maggiormente implicate nella progressione di questa condizione e, per questo motivo, più studiate sono il fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ), l' interleuchina 1 (IL-1) e l'interleuchina 6 (IL-6). Questi mediatori dell'infiammazione presentano alcune caratteristiche in comune e tutte agiscono in senso pro-infiammatorio (Anker & von Haehling, 2004).

Nonostante i diversi anni di studio dedicati alla ricerca di questa condizione, lo stimolo che induce lo stato infiammatorio in corso di insufficienza cardiaca rimane sconosciuto. Esistono diverse teorie inerenti l'attivazione del sistema immunitario in corso di insufficienza cardiaca cronica. La produzione delle citochine pro-infiammatorie è stata attribuita alle cellule mononucleate, anche se il miocardio sembra essere un'altra fonte importante. In corso di insufficienza cardiaca si pensa che l'attivazione delle cellule mononucleate avvenga in risposta alla necrosi tissutale in seguito a infarto miocardico, all'ipoperfusione cronica tissutale e alle alterazioni della permeabilità e della popolazione batterica nell'intestino ipoperfuso e che la produzione miocardica aumenti in seguito a stimolazione adrenergica cronica. L'alterazione della permeabilità intestinale permette il passaggio delle endotossine batteriche dal lume con conseguente produzione di citochine pro-infiammatorie dai monociti ed eventualmente da altri tessuti (Anker & von Haehling, 2004; Boswood, 2009; Dixon et al., 2011).

Inizialmente si pensava che le citochine fossero espresse solo in pazienti affetti da insufficienza cardiaca allo stadio terminale. A questa ipotesi aveva contribuito il fatto che i primi studi dimostravano livelli elevati di citochine (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-18) in pazienti affetti da insufficienza cardiaca congestizia e cachessia (Levine et al., 1990; ; Dutka et al., 1993; Katz et al., 1994; Matsumori et al., 1994; Torre-Amione et al., 1996; Seta et al., 2000; Bozkurt 2010). Tuttavia, come riportato da diverse pubblicazioni, ora è noto che le sostanze pro-infiammatorie si attivano durante le fasi precoci di insufficienza cardiaca (per esempio durante lo stadio NYHA II) e continuano ad incrementare con il peggioramento della classe funzionale di scompenso, indipendentemente dall'eziologia (Levine et al., 1990; Dutka et al., 1993; Katz et al., 1994; Matsumori et al., 1994; Torre- Amione et al., 1996; Muner et al., 1996; Testa et al., 1996; Seta et al., 1996; Aukrust et al., 1998; Tsutamoto et al., 1998; Aukrust et al., 1999; Deswal et al., 2001; Vasan et al.,

2003; Dunlay et al., 2008; Bozkurt et al., 2010). Livelli elevati di questi mediatori dell'infiammazione (TNF, IL-6 e recettori solubili di TNF -sTNFR 1, sTNFR2) in pazienti cardiopatici sono associati ad aumentata mortalità (Moler et al., 1997; Tsutamoto et al., 1998; Rauchhaus et al., 2000; Maeda et al., 2000; Deswal et al., 2001; Kell et al., 2002; Ferrari, 2002; Bozkurt et al., 2010) e secondo la teoria che vede le citochine infiammatorie coinvolte nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca, la progressione della patologia è almeno in parte causata dall'azione di queste sostanze (Oikonomou et al., 2011).

#### Relazione tra le citochine infiammatorie e l'insufficienza cardiaca

- Effetti delle citochine sulla funzionalità ventricolare sinistra: Diversi studi hanno messo in evidenza gli effetti delle citochine infiammatorie e di altri mediatori dell'infiammazione sulla funzionalità ventricolare sinistra (Valgimigli et al., 2005; Shah et al., 2006; Kawano et al., 2006; Frantz et al., 2006; Kosmala et al., 2008; Crysohoou et al., 2009; Oikonomou et al., 2011). Dati recenti dimostrano che le citochine infiammatorie come il TNF-alfa, il TNFR1 e l'IL-6 influenzano gli indici ecocardiografici che riflettono la funzione sistolica e diastolica del ventricolo sinistro e che bloccando gli effetti delle citochine infiammatorie sul miocardio viene inibita la progressione dell'insufficienza cardiaca (Valgimigli et al., 2005; Kawano et al., 2006; Frantz et al., 2006; Crysohoou et al., 2009; Oikonomou et al., 2011).
- Effetti delle citochine sul rimodellamento del ventricolo sinistro: Con il termine di "rimodellamento" si intendono le modificazioni delle dimensioni, della forma e della struttura del miocardio in risposta agli stimoli nocivi. Le citochine infiammatorie esercitano effetti importanti sul processo del rimodellamento ventricolare. Molti dei dati che esistono in bibliografia riguardano gli effetti dell'IL-1 e del TNF-alfa e dimostrano come livelli bassi di citochine infiammatorie correlano con gradi minori di rimodellamento ventricolare sinistro e viceversa (Frantz et al., 2003; Diwan et al., 2004; Oikonomou et al., 2011).
- Effetti delle citochine sull'endotelio: I pazienti affetti da insufficienza cardiaca presentano disfunzione endoteliale che causa alterazioni della

funzionalità miocardica e ridotto apporto ematico agli organi periferici spiegando parzialmente alcune delle caratteristiche dell'insufficienza cardiaca, come facile affaticabilità e alterata ossigenazione dei tessuti periferici (Parissis et al., 2002; Oikonomou et al., 2011). Le citochine infiammatorie causano disfunzione endoteliale in modi diversi. Prima di tutto, inducono la produzione di molecole di adesione e di citochine dalle cellule endoteliali, che a loro volta aumentano la risposta infiammatoria della parete vascolare. In secondo luogo, alterano l'equilibrio tra vasodilatatori (come l'NO) e vasocostrittori (es. endotelina-1) endogeni causando vasocostrizione (Tousoulis et al., 2005; Oikonomou et al., 2011) e stimolano la produzione di specie reattive dell'ossigeno, che a loro volta peggiorano la disfunzione endoteliale (Tousoulis et al., 2005; Oikonomou et al., 2011). Infine, Il TNF-alfa, che si conosce essere elevato in corso di insufficienza cardiaca, è stato implicato nell'induzione di apoptosi delle cellule endoteliali (Anker & Sharma, 2002; Oikonomou et al., 2011).

- Effetti delle citochine sui muscoli e su altri organi (cachessia): L'insufficienza cardiaca cronica è una sindrome dinamica che coinvolge diversi organi e apparati. Così, oltre al miocardio, i suoi effetti influenzano la funzione dell'apparato gastroenterico, dei reni e il sistema muscolo-scheletrico. La cachessia cardiaca è accompagnata da anoressia, perdita di peso, perdita di massa muscolare e di grasso corporeo, dalla modificazione del metabolismo epatico del glucosio e dei lipidi ed è associata a prognosi peggiore. Si pensa che la cachessia sia il risultato dell'interazione tra varie citochine, neuropeptidi, ormoni dello stress, e prodotti intermedi del metabolismo dei lipidi (Anker & Sharma, 2002; Oikonomou et al., 2011). Diversi studi hanno messo in evidenza che il TNF-a, l'IL-1 e l'IL-6 sono correlati a proteolisi, ad alterazioni del metabolismo lipidico (es. aumento della lipolisi), ad atrofia muscolare, ad apoptosi dei miociti e a perdita di peso (Sharma & Anker, 2002; Oikonomou et al., 2011).
- Effetti delle citochine sull'emopoiesi: L'anemia è una caratteristica comune dell'insufficienza cardiaca cronica che aggrava la funzione miocardica e la sintomatologia clinica mentre si associa a una prognosi peggiore (Kalleras et al., 2005; Oikonomou et al., 2011). Le citochine

infiammatorie interferiscono con la produzione di eritropoietina, alterano l'eritropoiesi attraverso apoptosi delle cellule progenitrici a livello di midollo osseo e inducono la produzione di epcidina dagli epatociti, la quale inibisce il rilascio di ferro dai macrofagi e l'assorbimento del ferro in sede intestinale (Okonko & Anker, 2004; Ganz, 2004; Oikonomou et al., 2011).

Diversi studi in campo umano hanno valutato gli effetti della terapia farmacologica sui livelli di citochine infiammatorie in pazienti affetti da insufficienza cardiaca (Maeda et al., 1997; Hernandez- Presa et al., 1997; Prabhu et al., 2000; Aronson et al., 2001; Otsuka et al., 2001; Tsutamoto et al., 2001; Gurlek et al., 2001; Loppnow et al., 2002; Matsumura et al., 2002 Wei et al., 2002; Gage et al., 2004; Bozkurt et al., 2010;) A seconda dello studio preso in considerazione e la combinazione dei farmaci usati, i risultati sono variabili ma si è visto che attraverso l'ottimizzazione della terapia cardiologica standard con diuretici, ACE-inibitori, farmaci beta-bloccanti e digossina si può ottenere l'abbassamento dei livelli dei mediatori dell'infiammazione (Maeda et al., 2000; Bozkurt et al., 2010) Questi risultati suggeriscono che ci sono delle importanti interazioni tra il sistema renina-angiotensina, il sistema simpatico e le citochine pro-infiammatorie e che alcuni trattamenti convenzionali per l'insufficienza cardiaca potrebbero essere efficaci almeno in parte nella modulazione della risposta infiammatoria (Bozkurt et al., 2010).

In medicina veterinaria, si è visto che la somministrazione di olio di pesce, ricco in acidi grassi poliinsaturi, in cani affetti da insufficienza cardiaca provoca l'abbassamento dei livelli di IL-1 e migliora il quadro di cachessia cardiaca (Freeman et al., 1998).

Di seguito vengono prese in considerazione singolarmente le citochine che, in campo umano, sono state più spesso implicate nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca e che sono state valutate nell'ambito di questo studio.

### Fattore di crescita tumore alfa (Tumour Necrosis Factor alpha –TNF-alfa)

Il fattore di necrosi tumorale ha preso il suo nome dall'iniziale osservazione di effetti inibitori su diverse cellule tumorali (Old, 1985; Kapadia et al., 1997; Oikonomou et al., 2011). Nel corso degli anni, gli studi effettuati in campo umano hanno dimostrato che i livelli di questa citochina aumentano nell'ambito di diverse patologie cardiache e che il TNF-alfa può esercitare i suoi effetti tossici direttamente sul cuore e sulla circolazione periferica (Kapadia et al., 2000). È stato dimostrato che quando viene espresso in eccesso, il TNF-alfa conduce a rimodellamento e disfunzione, sistolica e diastolica, ventricolare sinistra (Kapadia et al., 2000; Valgimigli, 2005; Oikonomou et al., 2011). A livello subcellulare, questa citochina pro-infiammatoria stimola l'ipertrofia dei miocardiociti attraverso la creazione di intermedi reattivi dell'ossigeno, causa inadeguato rimodellamento cardiovascolare attraverso la stimolazione del turnover della matrice extracellulare e della produzione delle sue proteine, causa apoptosi dei miocardiociti e delle cellule endoteliali, deprime la funzione miocardica attraverso anomalie della gestione del calcio cellulare, del ciclo della sfingomielinasi e dell'ossido nitrico ed altera la sensibilità dei beta recettori (Hagewisch et al., 1990; Katz et al., 1994; Packer 1995; Feldman et al., 2000; Adamopoulos et al., 2001; Oikonomou et al., 2011; Parissis et al., 2002; Valgimigli et al., 2005; Haudek et al., 2007; Hedayat et al., 2010). Studi in medicina umana hanno messo in evidenza che la sua concentrazione elevata in pazienti affetti da insufficienza cardiaca cronica rappresenta un fattore prognostico negativo e che i livelli di TNF-alfa sono correlati allo stadio funzionale di insufficienza cardiaca (NYHA), alla gravità clinica e all'attivazione neuro-ormonale (Levine et al., 1990; Matsumori et al., 1994; Torre- Amione et al., 1996; Ferrari 1998; Anker et al., 1997; Anker et al., 1997; Katz et al., 1994; Filippatos et al., 2000; Parissis et al., 2002; Oikonomou et al., 2011).

In medicina veterinaria, i livelli circolanti di TNF-alfa non erano misurabili in uno studio condotto mediante metodica ELISA in cani con malattia valvolare mitralica, l'espressione genica nel sangue periferico era bassa in cani affetti da insufficienza cardiaca a varia eziologia e l'espressione genica a livello di miocardiociti era significativamente più elevata in cani morti per malattia

mitralica che sottoposti ad eutanasia per altre cause (Paslawska et al., 2006; Fonfara et al., 2010; Zois et al., 2011).

### Interleuchina 6 (IL-6)

Questa è una citochina con effetti proinfiammatori, che viene espressa in diversi tessuti e organi, responsabile di segnali di proliferazione, di crescita, di differenziazione e di apoptosi (Hedayat et al., 2010). L'IL-6 e le citochine correlate all'IL-6 giocano un ruolo importante nella regolazione dell'ipertrofia e dell'apoptosi dei miocardiociti (Parissis et al., 2002). La cardiotrofina (CT-1), che appartiene alla famiglia dell' IL-6, è stata associata a diversi eventi cardiovascolari. Sembra che la sua produzione venga stimolata dalla dilatazione ventricolare e alcuni studi suggeriscono che possa essere coinvolta nel rimodellamento cardiaco (Jougasaki et al., 2003; Oikonomou et al., 2011).

Come per il TNF-alfa, livelli elevati di questa citochina si riscontrano in pazienti affetti da insufficienza cardiaca cronica, sono stati associati a una prognosi peggiore e sembra che possano prevedere lo sviluppo di segni congestizi in pazienti asintomatici (Parissis et al., 2002; Vasan et al., 2003; Anker & Von Haehling, 2004; Oikonomou et al., 2011). Infatti, sembra che la determinazione dei livelli sierici di IL-6 nel follow-up di pazienti affetti da insufficienza cardiaca cronica abbia un elevato valore predittivo riguardo allo sviluppo di nuovi episodi di scompenso o di morte (MacGowan et al., 1997; Roig et al., 2000; Orüs et al., 2000; Parissis et al., 2002). Studi in medicina umana hanno messo in evidenza che la concentrazione di IL-6 è correlata allo stadio funzionale dell'insufficienza cardiaca e alla funzione sistolica e diastolica del ventricolo sinistro (Roig et al., 1998; Deswal et al., 2001; Oikonomou et al., 2011).

In medicina veterinaria i livelli circolanti di IL-6 non erano misurabili in una elevata percentuale di soggetti in uno studio condotto mediante metodica immunoenzimatica in cani con malattia valvolare mitralica mentre l'espressione genica a livello di miocardiociti era significativamente più elevata in cani morti per malattia mitralica che sottoposti ad eutanasia per altre cause (Paslawska et al., 2006; Zois et al., 2011).

### Interleuchina 1 (IL-1)

L'IL-1 è stata la prima citochina ad essere scoperta e, insieme al TNF-alfa, è considerata il prototipo delle citochine pro-infiammatorie (Anker & Sharma, 2002). Sono state identificate due classi di IL-1: l'IL-1 $\alpha$  e l'IL-1 $\beta$  che presentano elevata omologia di sequenza e identiche attività biologiche (Bujak & Frangogiannis, 2009; Dinarello, 2011). È stato dimostrato che l'IL-1 è presente nel miocardio di pazienti affetti da miocardiopatia dilatativa e sembra che deprima la contrattilità miocardica in modo dose-dipendente (Anker & Sharma, 2002). Agisce in sinergia con il TNF-alfa e sembra essere coinvolta nell'apoptosi dei miocardiociti, nell'ipertrofia miocardica e nell'aritmogenesi (Anker & Sharma, 2002). Inoltre, sembra che sia in grado di indurre il rimodellamento ventricolare anomalo attraverso l'alterazione dell'espressione e dell'attività delle metalloproteinasi di matrice (MMP) e di accentuare la produzione di altri mediatori dell'infiammazione (Anker & Sharma, 2002; Bujak & Frangogiannis, 2009).

Un'aumentata espressione genica di IL-1 è stata riscontrata nel sangue periferico di cani con insufficienza cardiaca a varia eziologia e a livello di miocardiociti in cani morti per malattia mitralica che sottoposti ad eutanasia per altre cause (Paslawska et al., 2006; Fonfara et al. 2010).

### Interleuchina 8 (IL-8)

L'IL-8 appartiene alla famiglia delle citochine con attività chemotattica (chemochine) e ha potenti effetti pro-infiammatori. Viene prodotta da diversi tipi cellulari ed è responsabile della migrazione chemotattica e dell'attivazione delle cellule (neutrofili, monociti, linfociti, basofili ed eosinofili) nel sito di infiammazione (Feghali & Wright, 1997).

I macrofagi rappresentano la fonte principale di IL-8 (Dominguez-Rodriguez et al., 2006; Kaski 2000). I vari studi mettono in luce la possibilità che l'IL-8 possa essere in grado di stimolare la proliferazione delle cellule della muscolatura liscia, aumentare l'espressione della sintetasi inducibile dell'ossido nitrico, incrementare la produzione di elevate quantità di radicali dell'ossido nitrico, produrre matrice extracellulare e forme interstiziali di collagene (Sharma et al., 2000; Dominguez-



Rodriguez et al., 2006). Gli effetti dannosi che ne deriverebbero sono disfunzione endoteliale, deficit della riserva vascolare coronarica e della perfusione del tessuto miocardico, apoptosi dei miocardiociti e delle cellule endoteliali, e, infine, citotossicità e/o inibizione della contrazione miocitica (Sharma et al., 2000; Dominguez-Rodriguez et al., 2006).

In medicina veterinaria, in uno studio su cani affetti da endocardiosi mitralica, i livelli di IL-8 misurati con metodica immunoenzimatica tendevano a ridursi con il progredire della patologia e l'aumento delle dimensioni ventricolari nel sottogruppo costituito da cavalier King Charles Spaniel (Zois et al., 2011). Questa riduzione della concentrazione dell'IL-8 potrebbe indicare una minor attivazione immunologica nei cani di questa razza affetti dalla patologia mitralica rispetto ai pazienti umani nei quali i livelli di citochine vengono studiati prevalentemente nella malattia ischemica e nel corso della quale l'attivazione immunitaria è molto marcata (Zois et al., 2011). Infine, uno studio recente non ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'espressione genica di IL-8 nel sangue periferico di cani con insufficienza cardiaca a varia eziologia rispetto a cani sani (Fonfara et al. 2010).

#### Fattore di crescita trasformante beta (Transforming Growth Factor - TGF- $\beta$ )

Il fattore di crescita trasformante (Transforming Growth Factor beta – TGF- $\beta$ ) è un peptide multifunzionale, appartenente ai fattori di crescita, che ha un ruolo importante nella regolazione della crescita cellulare e nella differenziazione di diversi tessuti. Si pensa che questa potente citochina regoli l'inizio e la fine della riparazione tissutale e che la sua produzione prolungata o un difetto nella sua regolazione causi lo sviluppo di fibrosi miocardica (Border & Noble, 1994; Lim & Zhu, 2006). Nei mammiferi, esistono tre isoforme, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 (Lim & Zhu, 2006).

Gli studi effettuati in medicina veterinaria suggeriscono un coinvolgimento del sistema del TGF- $\beta$  nella patogenesi dell'endocardiosi valvolare mitralica. Si pensa che il TGF- $\beta$  intervenga nella trasformazione patologica delle cellule interstiziali valvolari (Obayashi et al., 2011). Le cellule interstiziali valvolari rappresentano il tipo cellulare prevalente nella valvola e presentano plasticità biologica con una combinazione di caratteristiche intermedie tra quelle dei fibroblasti e delle cellule

muscolari lisce. Si pensa che siano coinvolte nell'inizio e nella progressione della patologia mitralica (Oyama e Chittur, 2006) e diversi studi suggeriscono che una loro alterazione sia necessaria perchè si sviluppi la degenerazione valvolare.

L'endotelina, l'ossido nitrico, le metalloproteinasi (MMP) e le isoforme del fattore di crescita trasformante (TGF- $\beta$ 1, 2, 3) sono alcuni dei potenziali mediatori coinvolti in questo processo anche se il loro contributo rimane poco chiaro (Weber et al., 1994; Rizvi et al., 1996; Mow et al., 1999; Olsen et al., 2003; Rabkin et al., 2001; Aupperle et al., 2008; Disartian et al., 2008; Aupperle et al., 2009; Obayashi et al., 2011).

Nello studio effettuato da Oyama e Chittur è stata dimostrata up-regolazione di diversi sistemi molecolari nel tessuto valvolare di cani affetti, tra cui quelli dell'IL-6, del recettore per l'IL-1 e di alcuni recettori coinvolti nei sistemi di segnalazione della serotonina e di conseguenza del TGF- $\beta$ , suggerendo il coinvolgimento di queste molecole nella proliferazione e nella differenziazione delle cellule valvolari interstiziali, nel danno endoteliale e nella produzione anomala di matrice extracellulare (Oyama & Chittur, 2006; Disartian et al., 2009; ; Aupperle et al., 2008; Disartian 2010).

Si conosce poco sulle diverse funzioni di TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3; tuttavia si pensa che siano coinvolte nei meccanismi di trasformazione endoteliale-mesenchimale. La trasformazione endoteliale-mesenchimale avviene durante lo sviluppo embrionale del cuore: le cellule mesenchimali che formano i cuscinetti atrio-ventricolari, precursori delle valvole e dei setti cardiaci, derivano dall'endocardio tramite meccanismi di transizione endoteliale-mesenchimale.

Questo processo sembra iniziare in seguito a induzione da parte di segnali, come il TGF- $\beta$ , prodotti dal miocardio. E' stato dimostrato che la fibrosi cardiaca è associata alla nascita di fibroblasti da cellule endoteliali attraverso un meccanismo di transizione epiteliale-mesenchimale (Zeisberg et al., 2007).

Diversi studi evidenziano che il TGF- $\beta$  gioca un ruolo importante in questi processi stimolando le cellule endoteliali a produrre mediatori fibrogenici e inducendo la trasformazione endoteliale – mesenchimale. Sebbene i meccanismi che scatenano l'espressione di TGF- $\beta$  nel cuore fibrotico non siano noti, si pensa che lo stress emodinamico può dare origine al processo infiammatorio in prossimità della vascolatura intracardiaca provocando l'attivazione delle cellule

endoteliali che a loro volta producono mediatori fibrogenici e inducono attivazione fibroblastica e fibrosi miocardica (Zeisberg et al., 2007).

Inoltre, il fattore di crescita trasformante 3 regola la qualità e la quantità della matrice extracellulare ed ha un ruolo fondamentale nel rimodellamento delle valvole atrio-ventricolari nelle specie aviarie e, da studi effettuati in vitro sul cane, si pensa sia in grado di attivare i miofibroblasti valvolari e la sintesi di proteoglicani (Obayashi et al., 2011).

A livello cardiaco, la produzione di TGF- $\beta$  è stata associata oltre che a danno miocardico e sovraccarico di pressione, ad altre condizioni che possono accompagnare lo stato di insufficienza cardiaca, come aumento della concentrazione di angiotensina II ed epinefrina (Takahashi et al., 1994; Sun et al., 1998; Koyanagi et al., 2000; Sun & Weber, 2000; Kuwahara et al., 2002; Lim & Zhu, 2006).

Diversi studi hanno evidenziato un'interazione tra l'angiotensina II e il TGF- $\beta$ 1 ed è noto che queste due sostanze hanno un ruolo importante nella progressione della fibrosi miocardica, nell'ipertrofia e nell'insufficienza cardiaca (Gray et al., 1998; Lim & Zhu, 2006). L'angiotensina II stimola l'ipertrofia dei miocardiociti attraverso il rilascio paracrino di TGF- $\beta$ 1 e aumenta l'espressione del TGF- $\beta$ 1 nei fibroblasti cardiaci (Lim & Zhu, 2006). Il TGF- $\beta$ 1 viene espresso, oltre che dai fibroblasti miocardici, anche dai miocardiociti ed è stato implicato nella crescita delle cellule cardiache e nella fibrosi, attraverso l'aumento dell'espressione di collagene e fibronectina, eventi caratteristici del rimodellamento cardiaco (Thompson 1988; Eghbali, 1989; Villareal & Dillmann, 1992; Kupfahl et al., 2000; Koyanagi et al., 2000; Lim & Zhu, 2006). Inoltre, agisce stimolando l'aumento della sintesi della maggior parte delle proteine della matrice, riducendo la produzione degli enzimi proteolitici della degradazione della matrice, aumentando la produzione degli inibitori di queste proteasi e modulando l'espressione delle integrine in modo da aumentare l'adesione delle cellule alla matrice (Smith 1993; Border & Noble, 1994; Weber, 1997; Lim & Zhu, 2006).

Diversi studi hanno messo in evidenza che in seguito a un danno cardiaco l'espressione del TNF- $\alpha$ , dell'IL-1 $\beta$ , dell'IL-6, del TGF- $\beta$ 1 e del TGF- $\beta$ 3 è incrementata (Chen et al., 2004; Lim & Zhu, 2006). Il TNF- $\alpha$  può indurre in modo indipendente l'up-regolazione dei recettori dell'angiotensina I (AT-1) esaltando

gli effetti mediati dall'angiotensina II (AT 2) e di conseguenza del TGF- $\beta$  in favore della fibrosi (Lim & Zhu, 2006, Peng et al., 2002). Infine, uno studio recente dimostra che il TGF- $\beta$ 1 influenza in modo diretto la risposta di rimodellamento del cuore all'azione dell'angiotensina II (Schultz et al., 2002; Lim & Zhu, 2006; Polhers et al., 2009).

E' chiaro che il rimodellamento conduce a perdita della normale funzione miocardica e che questo rimodellamento strutturale dinamico ha un ruolo importante nella progressione dell'insufficienza cardiaca (Lim & Zhu, 2006; Pfeffer et al., 1995; Ju et al., 1997; Ju et al., 1998; Weber, 1997; Sutton et al., 2000; Hao et al., 2000).

## **2- CONTRIBUTO SPERIMENTALE**

## Scopo degli studi

L'endocardiosi mitralica, nota anche con il nome di degenerazione valvolare mixomatosa o malattia valvolare mitralica, è la patologia cardiaca acquisita più comune nel cane. Colpisce prevalentemente cani di piccola e media taglia e la sua prevalenza aumenta con l'avanzamento dell'età (Abbott, 2008). La patologia è causata dalla progressiva degenerazione mixomatosa della valvola mitralica, con o senza il coinvolgimento della valvola tricuspide, che causa la mancata coaptazione dei lembi valvolari e di conseguenza il rigurgito valvolare (Abbott, 2008; Olsen et al., 2010).

La fisiopatologia dell'insufficienza cardiaca, che ne consegue, è molto complessa e non del tutto conosciuta. Dagli studi effettuati in medicina umana fin dagli anni 60 è risultato che in corso di insufficienza cardiaca cronica avviene l'attivazione del sistema immunitario con produzione e rilascio di citochine, attivazione del complemento e produzione di autoanticorpi (Anker et al., 2004).

Le citochine sono proteine a basso peso molecolare, prodotte da diversi tipi cellulari (monociti, linfociti, miocardiociti), indispensabili per la propagazione e amplificazione della risposta infiammatoria. Sono responsabili del reclutamento cellulare nell'area di infiammazione, e stimolano la divisione, la proliferazione e la differenziazione cellulare (Oikonomou et al., 2011).

Numerosi studi in medicina umana hanno messo in evidenza che le citochine più spesso implicate in corso di insufficienza cardiaca sono l'interleuchina 1 (IL-1), l'interleuchina 6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale alfa (Tumour Necrosis Factor alpha, TNF- $\alpha$ ) che agendo sul miocardio determinano ulteriore deterioramento della funzione contrattile e provocano rimodellamento e disfunzione endoteliale. Inoltre, si è visto che i pazienti con insufficienza cardiaca ed elevate concentrazioni dei mediatori infiammatori presentano una prognosi peggiore (Levine et al., 1990; Neissner et al., 2009; Oikonomou et al., 2011).

In medicina veterinaria, il ruolo delle citochine infiammatorie in corso di insufficienza cardiaca non è stato ancora pienamente indagato ed è disponibile un limitato numero di pubblicazioni riguardanti questo argomento (Kiczak et al., 2008; Arndt et al., 2009; Oyama & Levy, 2010; Fonfara et al., 2010; Zois et al., 2011).

L'obiettivo degli studi oggetto di questa tesi è stato valutare l'esistenza di differenze nei livelli di citochine tra soggetti affetti da insufficienza mitralica a vario stadio di gravità e soggetti sani e di associazioni tra i livelli di citochine e parametri ecocardiografici di rimodellamento cardiaco. A tale scopo, inizialmente sono stati misurati i livelli plasmatici di IL-6 e del TNF- $\alpha$  mediante test ELISA canino e, successivamente, è stata analizzata l'espressione genica di alcune citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) nelle cellule mononucleate mediante RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) in soggetti sani e affetti da patologia mitralica.

## **STUDIO 1**

Obiettivo di questa prima parte dello studio è stato quello di valutare il potenziale ruolo di TNF- $\alpha$  e IL-6 nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca conseguente a malattia valvolare mitralica mediante:

- Misurazione delle concentrazioni sieriche di IL-6 e TNF- $\alpha$  in cani sani e con insufficienza cardiaca a vario stadio funzionale conseguente a malattia valvolare mitralica cronica;
- Valutazione dell'esistenza di associazioni tra i livelli circolanti di citochine e parametri ecocardiografici di funzione ventricolare sinistra e rimodellamento cardiaco.

## **MATERIALI E METODI**

### **Animali**

Cani di proprietà sottoposti a visita cardiologica specialistica presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) del Dipartimento di Salute Animale dell'Università degli studi di Parma nel periodo gennaio 2009 – luglio 2010 sono stati arruolati in modo prospettico nello studio previo consenso informato del proprietario. Le visite cardiologiche specialistiche effettuate presso la suddetta struttura universitaria includono la raccolta dell'anamnesi remota e recente, il segnalamento, l'esecuzione di un elettrocardiogramma in 6-derivazioni (standard e unipolari toraciche), dell'esame radiografico del torace in due proiezioni (latero-laterale destra e dorso-ventrale), dell'esame ecocardiografico ed ecoDoppler ed il prelievo di un campione di sangue venoso per esami di laboratorio.

I soggetti arruolati dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione:

- Visita cardiologia specialistica effettuata sempre dallo stesso medico veterinario (AM);
- Esame radiografico effettuato presso l'Unità Operativa di Diagnostica per Immagini dell'OVUD dell'Università degli studi di Parma;
- Cani di razza e incroci;
- Cani di entrambi i sessi;



- Et   $\geq 5$  anni;
- Peso compreso tra 5 e 20 kg;
- Soggetti esenti da cardiopatie congenite o acquisite diverse da malattia valvolare mitralica cronica (MVMC);
- Soggetti con anamnesi muta per malattie infettive o neoplasie in atto o recenti (meno di 1 anno), malattie infiammatorie acute o croniche, insufficienza renale acuta e cronica, patologie del tessuto connettivo, febbre;
- Soggetti con pressione arteriosa sistolica sistemica misurata con flussimetria Doppler  $< 160$  mmHg;
- Soggetti con valori emato-chimici nel range di normalit  del laboratorio utilizzato (Laboratorio di ematologia e biochimica-clinica della Sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Salute Animale dell'Universit  degli studi di Parma);
- Soggetti non in terapia cardiologica al momento dell'inclusione.

Cani che soddisfacevano i suddetti criteri, ma risultati esenti da MVMC, sottoposti a visita cardiologica specialistica preventiva in quanto a rischio di sviluppare malattia valvolare mitralica o in ambito di visita preanestesiologica in soggetti da sottoporre a ovarioisterectomia o castrazione non terapeutiche, sono stati arruolati come controlli.

### **Raccolta dei dati clinici e classificazione dei cani**

I cani arruolati sono stati allocati alle diverse classi funzionali di insufficienza cardiaca sulla base dei rilievi clinici, radiografici, ed ecocardiografici.

### ***Sintomi e segni clinici***

Sono stati valutati tolleranza all'esercizio fisico, stato del sensorio, appetito, tosse, tachipnea, sforzo respiratorio, dispnea notturna, sincope e body condition score (BCS). A queste variabili   stato attribuito un punteggio (tabella 1). I cani inclusi, per essere considerati asintomatici, dovevano presentare punteggio 1 nei parametri sincope, stato del sensorio, tachipnea, dispnea, e sforzo respiratorio;

punteggio 1 o 2 nei parametri tolleranza all'esercizio fisico, appetito, tosse, punteggio  $\geq 3$  per il BCS.

SINTOMO	PUNTEGGIO	DESCRIZIONE
<b>Tolleranza all'esercizio fisico</b>	1	(Molto buona) – capace di muoversi con facilità; no limitazioni; capace di sostenere piena attività
	2	(Buona) - capace di muoversi con facilità; incapace di sostenere piena attività; la capacità alla corsa è ridotta
	3	(Media) - meno attivo del normale; si muove di meno; evita attività prolungata nel tempo
	4	(Scarsa)- scarsamente attivo; si muove solo per alimentarsi e urinare
<b>Sensorio</b>	1	Vigile
	2	Lievemente letargico
	3	Moderatamente letargico
	4	Poco reattivo
	5	Non reattivo
<b>Appetito</b>	1	Aumentato
	2	Normale
	3	Diminuito (2/3 del normale)
	4	Marcatamente diminuito (<2/3 del normale)
<b>Sforzo respiratorio</b>	1	Normale
	2	Lieve aumento dello sforzo o della frequenza
	3	Moderatamente laborioso
	4	Sforzo respiratorio grave
<b>Tosse</b>	1	No
	2	Occasionale (pochi colpi alla settimana)
	3	Frequente (pochi colpi al giorno)
	4	Persistente (frequente durante il giorno)

<b>Dispnea notturna</b>	1	No
	2	Tosse poco frequente durante la notte ma assenza di segni di dispnea e irrequietezza
	3	Tosse persistente durante la notte con aumento dello sforzo respiratorio e irrequietezza
<b>Episodi di tachipnea</b>	1	No
	2	occasionali (pochi episodi/settimana)
	3	Frequenti (pochi episodi/giorno)
	4	Persistenti (frequente/giorno)
<b>Episodi sincopali</b>	1	nessuno
	2	≤ 4 al mese
	3	> 4 al mese
<b>Body condition score (BCS)</b>	1	<b>Molto magro/emaciato</b> (le costole, la colonna vertebrale, la spina della scapola e le ossa dell'anca sono prominenti e visibili; marcata perdita di massa muscolare; no grasso palpabile a livello di cassa toracica)
	2	<b>Magro/ sottopeso</b> (le costole, la colonna vertebrale, la spina della scapola e le ossa dell'anca sono visibili; marcata rientranza del profilo addominale (a livello di "vita"); no grasso palpabile a livello di cassa toracica)
	3	<b>Ideale</b> (le costole, la colonna vertebrale, la spina della scapola e le ossa dell'anca non sono visibili ma facilmente palpabili; marcata rientranza del profilo addominale (a livello di "vita"); palpabile uno strato sottile di grasso a livello di cassa toracica)
	4	<b>Sovrappeso</b> (le costole, la colonna vertebrale, la spina della scapola e le ossa dell'anca sono difficilmente palpabili; assenza della rientranza del profilo addominale (a livello di "vita"); presenza di depositi di grasso a livello di colonna vertebrale e alla base della coda)
	5	<b>Obeso</b> (abbondanti depositi di grasso a livello di torace, colonna e base della coda; marcatata distensione addominale)

**Tabella 1:** Sintomi e segni clinici con relativi punteggi (The IMPROVE study group, 1995; Häggström et al., 2008; Bernay et al., 2010)

### ***Esame radiografico***

E' stata valutata e caratterizzata con punteggio clinico la presenza di edema polmonare (tabella 2).

	<b>PUNTEGGIO</b>	<b>DESCRIZIONE</b>
<b>Edema polmonare</b>	1	No
	2	Lieve pattern interstiziale
	3	Moderato pattern interstiziale
	4	Pattern alveolare, grave consolidamento

**Tabella 2:** Presenza di edema polmonare e relativo punteggio (Häggröm et al., 2008)

### ***Esame elettrocardiografico***

L'esame elettrocardiografico è stato effettuato utilizzando un elettrocardiografo Cardioline plus a tre canali, su soggetto contenuto in decubito laterale destro e sono stati annotati per ciascun cane la frequenza cardiaca, il ritmo di base e le eventuali aritmie presenti.

### ***Esame ecocardiografico***

L'esame ecocardiografico è stato effettuato su soggetti non sedati, contenuti in decubito laterale destro e sinistro su apposito tavolo per ecocardiografia, utilizzando un apparecchio Megas CPV (Esaote Biomedica) montante sonde elettroniche phased-array con frequenze variabili da 2,5 a 7,5 MHz a seconda della taglia dell'animale e del tipo di valutazione ecocardiografica da effettuare.

L'esame ecocardiografico è stato eseguito per via transtoracica secondo gli standard utilizzando proiezioni parasternali destre, sinistre e la proiezione retrosternale (Thomas et al., 1993). In particolare, per gli obiettivi di questo studio la valutazione ecocardiografica ha incluso:

Proiezione parasternale destra asse corto:

- M-mode del ventricolo sinistro;
- Diametro aorta e diametro atrio sinistro con ratio atrio sinistro/aorta aorta (Hägström et al., 1994);
- Doppler del flusso polmonare.

Proiezione parasternale destra asse lungo 4-camere:

- Valutazione morfologica dell'apparato valvolare mitralico.

Proiezione parasternale sinistra apicale 4-camere:

- Valutazione morfologica dell'apparato valvolare mitralico e tricuspide;
- Color mapping dell'eventuale rigurgito mitralico;
- Doppler continuo del rigurgito mitralico;
- Flusso diastolico transmitralico.

Proiezione parasternale sinistra craniale asse corto ottimizzata per la valvola tricuspide:

- Valutazione morfologica dell'apparato tricuspide;
- Doppler continuo dell'eventuale rigurgito tricuspide.

Proiezione retrosternale:

- Doppler del flusso aortico.

Ai fini della successiva allocazione dei cani inclusi nello studio alle diverse classi funzionali di insufficienza cardiaca e della valutazione statistica sono stati in particolare estrapolati parametri ecocardiografici collegati alla funzione ventricolare sinistra, al rimodellamento cardiaco e alla gravità della malattia valvolare mitralica:

- Rapporto atrio sinistra/aorta;
- Rapporto E/A e velocità di picco onda E del flusso transmitralico;
- Diametro del ventricolo sinistro in telediastole e parametri correlati:

- Valore normalizzato secondo Cornell (VDd/peso corporeo<sup>0,294</sup>) (Cornell et al., 2004);
- Diametro del ventricolo sinistro in sistole e parametri correlati:
  - Valore normalizzato secondo Cornell (VDs/peso corporeo<sup>0,315</sup>) (Cornell et al., 2004);
- Frazione di accorciamento;
- Frazione di eiezione;
- Presenza o assenza di ipertensione polmonare sulla base della velocità del rigurgito tricuspideale (normale se  $\leq 2,8$  m/sec) (Schober & Baade, 2006; Johnson, 2006; Kullum & Stepien, 2007).

### **Classificazione dei cani**

E' stata utilizzata la classificazione della New York Heart Academy (NYHA) modificata (tabella 3) (Kvart C. et al., 2002; Häggström J. et al., 2008). I cani sono stati allocati alle diverse classi sulla base dei sintomi, del quadro radiografico e dei parametri ecocardiografici.

<b>CLASSE 0</b>	Cani clinicamente sani, senza soffio cardiaco e con esame ecocardiografico nella norma
<b>CLASSE 1</b>	Cani asintomatici, con soffio cardiaco ma senza segni di ingrandimento delle camere cardiache
<b>CLASSE 2</b>	Cani asintomatici, con soffio cardiaco, segni di ingrandimento delle camere cardiache ma senza segni radiografici di congestione venosa o edema polmonare
<b>CLASSE 3</b>	Cani lievemente o moderatamente sintomatici, soffio cardiaco, ingrandimento cardiaco ed edema polmonare interstiziale
<b>CLASSE 4</b>	Cani gravemente sintomatici, con soffio cardiaco, ingrandimento cardiaco ed edema polmonare alveolare

**Tabella 3:** Classificazione NYHA (New York Heart Association) modificata di insufficienza cardiaca nei cani con malattia valvolare mitralica (Kvart C et al., 2002; Häggström J et al., 2008).

### **Raccolta dei campioni di sangue**

In ambito di visita cardiologica specialistica effettuata presso l'OVUD viene di routine prelevato un campione di sangue venoso, su soggetti a digiuno da almeno 12 ore, e raccolto in una provetta contenente EDTA e una provetta contenente litio eparina come anticoagulanti. Sul campione di sangue vengono effettuati i seguenti esami di laboratorio: esame emocromocitometrico con formula leucocitaria, urea, creatinina, bilirubina totale, GPT, gamma-GT, fosfatasi alcalina, proteine totali, albumine, globuline, rapporto albumine/globuline, colesterolo, trigliceridi, sodio, potassio, cloro, rapporto sodio/potassio, calcio, fosforo.

Sui cani arruolati e che, come tali, dovevano presentare valori agli esami sopra elencati entro i range di normalità del laboratorio di riferimento, successivamente all'inclusione nello studio e comunque entro 72 ore dalla visita cardiologica specialistica e dall'ottenimento del consenso informato del proprietario, è stato effettuato un ulteriore prelievo di sangue venoso. Cinque millilitri sono stati raccolti in una provetta da siero e tenuti a temperatura ambiente per 2 ore prima della centrifugazione per 20 minuti a 1000 x g. Il siero ottenuto è stato suddiviso in due aliquote e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi.

### **Misurazione delle citochine sieriche**

Le concentrazioni sieriche delle citochine TNF- $\alpha$  e IL-6 sono state misurate presso il Laboratorio di Immunologia della Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria del Dipartimento di Salute Animale dell'Università degli studi di Parma mediante esame immunoenzimatico (ELISA) utilizzando kit ELISA disponibili in commercio (Quantikine, R&D Systems, USA) specifici per il cane e un lettore di piastre Victor<sup>3</sup> 1420 (Perkin Elmer). Tutti i campioni sono stati esaminati in duplicati. Le concentrazioni minime medie rilevabili con i kit utilizzati erano 2.4 pg/mL (0,9-4,2 pg/ml) per il TNF- $\alpha$  e 6.1 pg/mL (1.5-11.8 pg/ml) per IL-6.

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando un software per statistica commerciale (R Development Core Team. R foundation for Statistical Computing, 2009). Valori di  $P < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi. I risultati della statistica descrittiva sono riportati come mediana e range interquartile.

Il confronto tra i gruppi relativamente ai valori di citochine è stato effettuato utilizzando la regressione Tobit per dati censurati sia utilizzando la classificazione clinica in 5 livelli che collassando i malati in un unico livello (in modo da avere una variabile dicotoma malato/sano) usando i limiti di rilevabilità forniti dalla ditta produttrice del kit così come quelli osservati (le minime osservazioni non nulle) e dicotomizzando a zero, nonché attraverso analisi delle tabelle di contingenza mediante test di Fisher ottenute dicotomizzando le citochine sulla base dei limiti di rilevabilità forniti e anche dicotomizzando a 0: cioè soggetti con misure 0 e soggetti con misure diverse da zero.



## **Risultati**

Sono stati inclusi nello studio 33 cani, di cui 27 affetti da malattia valvolare mitralica. Sei cani sani sono stati usati come controllo (Classe 0). Dei 27 cani affetti da MVM, 7 sono stati allocati alla classe 1, 8 alla classe 2, 9 alla classe 3 e 3 cani alla classe 4. Nella tabella 4 sono riportate le caratteristiche segnaletiche, cliniche, elettrocardiografiche e radiografiche dei cani inclusi. Nella tabella 5 sono riportati i dati ecocardiografici dei cani inclusi.

Lo studio ha arruolato 12 femmine e 21 maschi, con un'età mediana di 12 anni (range interquartile IQR: 10-12) e peso corporeo mediano di 11,5 kg (IQR 8,3 – 14,5).

Nella tabella 6 sono riportati i valori di IL-6 e TNF- $\alpha$  rilevati nei cani dello studio e nella tabella 7 sono riportate le statistiche sommarie relative ai valori sierici di IL-6 e TNF- $\alpha$  nelle varie classi di insufficienza cardiaca.

Nelle figure 1 e 2 sono rappresentati i boxplot di TNF- $\alpha$  e IL-6, rispettivamente.

Nome	NYHA	Sesso	Età (anni)	kg	BSA	Episodi sincopali	Tolleranza esercizio	Sensorio	Appetito	Episodi di tachipnea	Sforzo respiratorio	Tosse	Dispnea notturna	BCS	Edema polmonare	Aritmie	FC
Incrocio	1	FS	10	11	0,49	1	1	1	2	1	1	1	1	4	1	NA	105
Incrocio	1	M	8	8,3	0,41	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	105
Incrocio	1	FS	12	14,2	0,59	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	AVCs	150
Incrocio	1	M	12	12,3	0,53	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Incrocio	1	FS	9	7,25	0,37	1	1	1	2	1	1	2	1	3	1	NA	120
Incrocio	1	M	14	13	0,55	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	120
Barbone	1	M	13	14,5	0,59	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	120
Incrocio	2	MC	12	18,7	0,67	1	1	1	1	2	1	2	1	5	1	NA	90
Incrocio	2	M	9	18	0,69	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	150
Incrocio	2	M	8	7,1	0,37	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Incrocio	2	M	12	5,45	0,31	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	AVCs	120
Incrocio	2	M	9	17,5	0,74	1	1	1	2	1	1	2	2	3	1	NA	120
Incrocio	2	MC	12	15	0,61	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Incrocio	2	FS	12	11,5	0,51	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	AVCs	90
Barbone	2	FS	12	6,1	0,32	2	1	1	2	1	1	1	1	4	1	NA	120
Incrocio	3	M	10	12,7	0,49	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	150
Incrocio	3	MC	9	11,3	0,5	2	2	1	2	2	2	3	1	4	1	NA	210
Incrocio	3	FS	13	10,8	0,49	2	2	1	3	2	3	2	1	4	2	VPCs	210
Yorkshire	3	M	10	5,4	0,31	2	2	1	3	2	2	1	1	3	2	NA	165
Incrocio	3	MC	12	8,6	0,42	1	2	2	2	2	1	3	2	3	2	AVCs + VPCs	120
Incrocio	3	FS	9	15,2	0,61	1	2	1	2	2	2	4	2	3	3	NA	150
Incrocio	3	MC	10	13,1	0,56	1	2	1	2	1	1	3	2	2	2	AVCs	170
Incrocio	3	FS	12	17	0,66	2	2	1	1	2	1	3	2	4	2	AVCs	120
Incrocio	3	M	13	9	0,42	1	2	1	1	3	2	4	2	4	2	NA	180
Incrocio	4	F	11	16	0,63	1	4	1	4	2	2	1	1	3	2	FA	200
Incrocio	4	M	17	16,6	0,65	1	3	1	2	3	2	4	3	4	3	AVCs	180
Incrocio	4	M	11	13	0,55	2	4	2	4	2	2	1	1	1	2	FA	190
Westie	0	M	7	11	0,49	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Cocker	0	FS	10	8	0,4	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	120
Yorkshire	0	M	12	6,5	0,35	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	120
Incrocio	0	FS	13	12,5	0,54	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Incrocio	0	FS	10	9,7	0,45	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	105
Incrocio	0	M	14	8,3	0,41	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90

**Tabella 4:** Segnalamento, punteggio dei sintomi clinici, dei segni radiografici e reperti elettrocardiografici dei cani inclusi nello studio. Legenda: F= femmina; FS= femmina sterilizzata; M= maschio; MC= maschio castrato; BSA=body surface area; BCS=body condition score; NA= non accertata, soggetto in ritmo sinusale

Nome	NYHA	Sesso	Età (anni)	kg	BSA	DVSd	DVSd Cornell	DVSs	DVSs Cornell	AS/AO	FA	FE m-mode	E/A	Picco E	PHT
Incrocio	1	FS	10	11	0,49	3,64	1,80	2,34	1,10	1,45	36	66	0,94	0,3	NO
Incrocio	1	M	8	8,3	0,41	3,1	1,66	1,51	0,78	1,34	51	84	0,99	0,76	SI
Incrocio	1	FS	12	14,2	0,59	3,95	1,81	2,08	0,90	1,37	47	79	0,99	0,86	NO
Incrocio	1	M	12	12,3	0,53	3,85	1,84	2,34	1,06	1,07	39	70	0,82	0,2	NO
Incrocio	1	FS	9	7,25	0,37	2,37	1,32	1,16	0,62	1,35	30	59	1,44	0,82	NO
Incrocio	1	M	14	13	0,55	3,6	1,69	2,3	1,03	1,3	36	67	1,06	0,75	NO
Barbone	1	M	13	14,5	0,59	3,71	1,72	2,09	0,92	1,45	44	76	1,16	0,85	NO
Incrocio	2	MC	12	18,7	0,67	4,44	1,88	2,57	1,02	1,36	42	73	1,05	0,99	NO
Incrocio	2	M	9	18	0,69	5,16	2,20	2,84	1,14	1,73	45	76	1,28	1,33	NO
Incrocio	2	M	8	7,1	0,37	3,78	2,12	1,94	1,05	1,48	49	81	0,86	0,63	NO
Incrocio	2	M	12	5,45	0,31	3,62	2,19	1,87	1,10	1,33	48	81	1,26	0,83	NO
Incrocio	2	M	9	17,5	0,74	4,92	2,12	3,15	1,28	1,47	36	65	0,97	1,01	NO
Incrocio	2	MC	12	15	0,61	4,44	2,00	2,4	1,02	1,91	46	77	1,47	0,78	NO
Incrocio	2	FS	12	11,5	0,51	4,36	2,13	2,12	0,98	1,36	51	83	1,29	0,94	NO
Barbone	2	FS	12	6,1	0,32	3,42	2,01	1,73	0,98	1,38	50	82	0,93	0,7	NO
Incrocio	3	M	10	12,7	0,49	4,75	2,25	2,45	1,10	2,2	48	80	2,1	1,22	SI
Incrocio	3	MC	9	11,3	0,5	4,68	2,29	2,32	1,08	2,83	50	82	1,27	1,49	SI
Incrocio	3	FS	13	10,8	0,49	3,67	1,82	1,87	0,88	2,35	49	81	1,71	1,18	SI
Yorkshire	3	M	10	5,4	0,31	3,87	2,36	2,24	1,32	1,89	42	74	1,7	1,14	SI
Incrocio	3	MC	12	8,6	0,42	4,46	2,37	2,63	1,34	2,09	41	72	1,42	1,11	NO
Incrocio	3	FS	9	15,2	0,61	5,12	2,30	2,8	1,19	1,72	45	76	1,19	1,36	NO
Incrocio	3	MC	10	13,1	0,56	5,71	2,68	3,4	1,51	2,52	40	70	2,24	1,61	SI
Incrocio	3	FS	12	17	0,66	4,75	2,07	2,44	1,00	2,02	49	80	1,44	1,76	NO
Incrocio	3	M	13	9	0,42	4,61	2,46	2,59	1,32	2,17	44	75	1,45	1,1	No
Incrocio	4	F	11	16	0,63	4,56	2,02	2,64	1,10	2,39	42	73	NA	1,36	SI
Incrocio	4	M	17	16,6	0,65	4,44	1,94	2,53	1,04	1,93	43	74	2	1,3	SI
Incrocio	4	M	11	13	0,55	5,55	2,6	3,29	1,47	2,37	41	71	NA	1,86	SI
Westie	0	M	7	11	0,49	3,42	1,69	1,84	0,86	1,12	46	79	0,94	0,65	NO
Cocker	0	FS	10	8	0,4	2,38	1,29	1,8	0,94	1,28	51	24	0,92	0,59	NO
Yorkshire	0	M	12	6,5	0,35	2,81	1,62	1,3	0,72	1,54	54	86	0,74	0,52	NO
Incrocio	0	FS	13	12,5	0,54	3,6	1,71	2,3	1,04	1,3	36	67	1,06	0,75	NO
Incrocio	0	FS	10	9,7	0,45	2,34	1,20	1,58	0,77	1,24	32	63	0,88	0,58	NO
Incrocio	0	M	14	8,3	0,41	2,78	1,49	1,9	0,98	1,08	32	62	2,05	0,85	NO

**Tabella 5:** Segnalamento e dati ecocardiografici dei cani inclusi nello studio. Legenda: F= femmina; FS= femmina sterilizzata; M= maschio; MC= maschio castrato; BSA=body surface area; BCS=body condition score; DVSd= diametro ventricolo sinistro in diastole; DVSs=diametro ventricolo sinistro in sistole; EDVI= indice di volume telediastolico; ESVI=indice di volume sistolic; FA=frazione di accorciamento; FE=frazione di eiezione; PHT=ipertensione polmonare; NA= non accertata

Nome	NYHA	Sesso	Età (anni)	kg	BSA	IL-6	TNF-alfa
Incrocio	1	FS	10	11	0,49	21,56	0
Incrocio	1	M	8	8,3	0,41	9,88	0
Incrocio	1	FS	12	14,2	0,59	28,05	4,6
Incrocio	1	M	12	12,3	0,53	0	0
Incrocio	1	FS	9	7,25	0,37	0	1,39
Incrocio	1	M	14	13	0,55	22,46	17,48
Barbone	1	M	13	14,5	0,59	0	1,75
Incrocio	2	MC	12	18,7	0,67	0	0
Incrocio	2	M	9	18	0,69	0	0
Incrocio	2	M	8	7,1	0,37	12,33	0
Incrocio	2	M	12	5,45	0,31	31,9	0,2
Incrocio	2	M	9	17,5	0,74	0	0
Incrocio	2	MC	12	15	0,61	0	3,29
Incrocio	2	FS	12	11,5	0,51	0	0,73
Barbone	2	FS	12	6,1	0,32	0	0
Incrocio	3	M	10	12,7	0,49	0	0
Incrocio	3	MC	9	11,3	0,5	0	0
Incrocio	3	FS	13	10,8	0,49	0	0
Yorkshire	3	M	10	5,4	0,31	0	0
Incrocio	3	MC	12	8,6	0,42	0	2,2
Incrocio	3	FS	9	15,2	0,61	0	0
Incrocio	3	MC	10	13,1	0,56	48,84	0
Incrocio	3	FS	12	17	0,66	372,29	0
Incrocio	3	M	13	9	0,42	0	1,98
Incrocio	4	F	11	16	0,63	0	0,03
Incrocio	4	M	17	16,6	0,65	0	13,54
Incrocio	4	M	11	13	0,55	0	0,71
Westie	0	M	7	11	0,49	0	0,25
Cocker	0	FS	10	8	0,4	0	0
Yorkshire	0	M	12	6,5	0,35	0	0
Incrocio	0	FS	13	12,5	0,54	0	0
Incrocio	0	FS	10	9,7	0,45	0	0
Incrocio	0	M	14	8,3	0,41	0	0

**Tabella 6:** Valori delle citochine sieriche misurate con kit ELISA

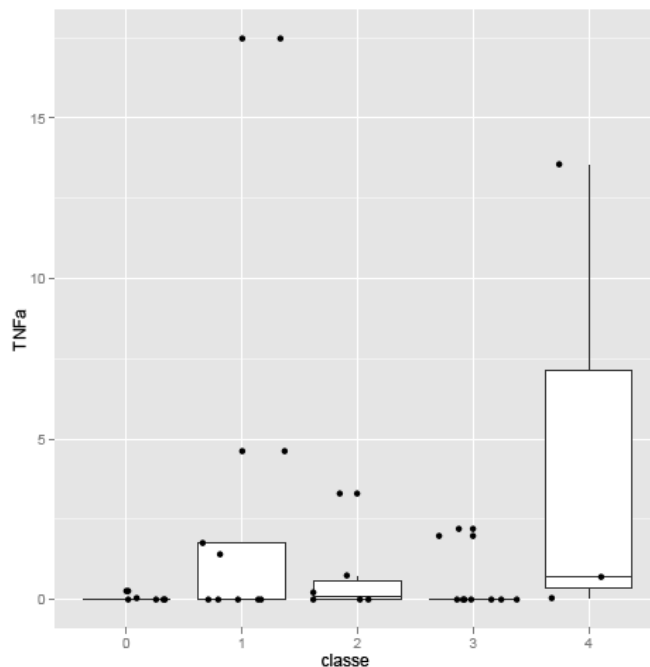
classe	n	Limite di rilevabilità	% sopra al limite di rilevabilità	% di valori nulli	Minimo valore non nullo	Minimo	25%le	Mediana	75%le	Massimo
0	6	6.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.00
1	7	6.1	55.56	55.56	9.88	0.00	0.00	9.88	21.56	28.05
2	8	6.1	16.67	16.67	31.90	0.00	0.00	0.00	0.00	31.90
3	9	6.1	22.22	22.22	48.84	0.00	0.00	0.00	0.00	372.29
4	3	6.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00
Tutte	33	6.1	24.24	24.24	9.88	0.00	0.00	0.00	0.00	372.29

**IL-6**

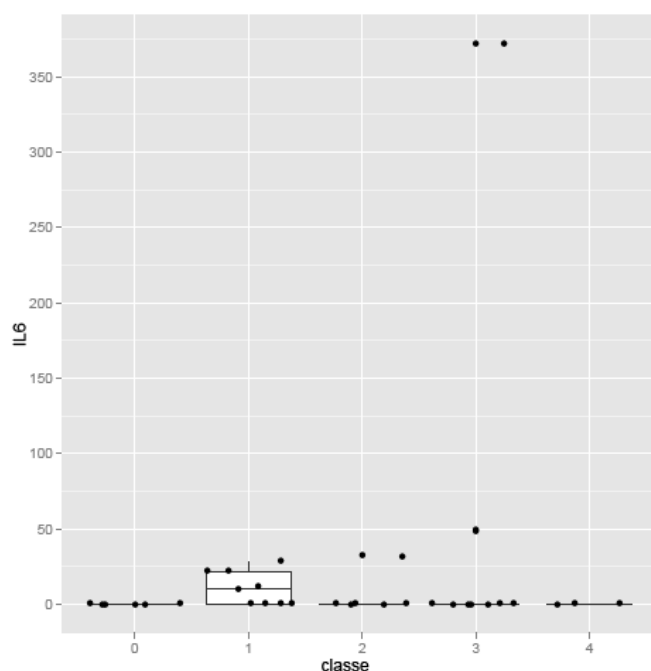
classe	n	Limite di rilevabilità	% sopra al limite di rilevabilità	% di valori nulli	Minimo valore non nullo	Minimo	25%le	Mediana	75%le	Massimo
0	6	2.4	0.00	16.67	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25
1	7	2.4	22.22	44.44	1.39	0.00	0.00	0.00	1.75	17.48
2	8	2.4	16.67	50.00	0.20	0.00	0.00	0.10	0.60	3.29
3	9	2.4	0.00	22.22	1.98	0.00	0.00	0.00	0.00	2.20
4	3	2.4	33.33	100.00	0.03	0.03	0.37	0.71	7.12	13.54
Tutte	33	2.4	12.12	39.39	0.03	0.00	0.00	0.00	0.73	17.48

**TNF-alfa**

**Tabella 7:** statistiche sommarie relative ai valori sierici di IL-6 e TNF-alfa nelle varie classi di insufficienza cardiaca



**Figura 1:** Il Boxplot mostra i valori di mediana e interquartili di TNF-alfa per ciascuna classe di insufficienza cardiaca. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le classi ( $p > 0.05$ ).



**Figura 2:** Il Boxplot mostra i valori di mediana e interquartili di IL-6 per ciascuna classe di insufficienza cardiaca. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le classi ( $p > 0.05$ ).

L'analisi tabellare (dicotomizzando in positivo-negativo sia al limite di rilevabilità dichiarato che a quello empirico) e quella "tobit" (per dati censurati) non hanno permesso di evidenziare differenze statisticamente significative ( $p > 0.05$ ) fra le varie classi di gravità sia per IL-6 che per TNF- $\alpha$ . Non è stato possibile dal punto di vista statistico effettuare studi di associazione tra livelli sierici di IL-6 e TNF- $\alpha$  e parametri ecocardiografici di funzione sistolica e rimodellamento cardiaco a causa del limite di rilevabilità del test e la ridotta dimensione campionaria.

## Discussione

Lo studio effettuato non ha permesso di evidenziare differenze significative tra cani sani e cani affetti da malattia valvolare mitralica cronica e tra le varie classi di insufficienza cardiaca nei livelli circolanti di IL-6 e TNF- $\alpha$  misurati mediante ELISA. Questo risultato è in contrasto con quanto riportato nell'uomo. In particolare, diversi studi hanno dimostrato che i livelli circolanti di TNF- $\alpha$  ed IL-6 sono elevati in corso di insufficienza cardiaca cronica, sono correlati alla gravità della malattia e alla classe NYHA di insufficienza cardiaca, sono correlati con la prognosi e la sopravvivenza e possono essere modificati dalla terapia per insufficienza cardiaca (Levine et al, 1990; Stenvinkel et al, 1999; Kapadia et al., 2000; Rauchhaus M et al., 2000; Deswal et al, 2001; Gurlek et al., 2001; Ohtsuka et al, 2001; Kell et al., 2002; Dunlay et al., 2008; Bozkurt et al., 2010).

Molti di questi studi sono stati condotti su pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa o cardiopatia ischemica e la diversa natura della patologia cardiaca potrebbe giustificare la discrepanza nei risultati: differenze nelle concentrazioni sieriche di citochine in relazione alla causa di insufficienza cardiaca sono state dimostrate nel ratto e nell'uomo (Vistnes et al, 2010; Yamahoka-Tojo et al., 2002). In effetti, si ritiene che la malattia coronarica e la cardiomiopatia dilatativa nell'uomo abbiano un'origine infiammatoria (Fairweather & Rose, 2005; Hansson et al., 2006; Hedayat et al, 2010). Al contrario, la malattia valvolare mitralica del cane è considerata non infettiva e non infiammatoria, in quanto cellule infiammatorie risultano assenti all'esame istologico della valvole patologiche e del miocardio (Buchanan, 1977; Abbott, 2008; Olsen et al., 2010).

Tuttavia, uno studio condotto nel 2000 in pazienti umani affetti da insufficienza mitralica utilizzando un kit analogo a quello utilizzato in questo studio, ma specifico per l'uomo, ha dimostrato che i livelli di TNF- $\alpha$  erano significativamente più elevati nei pazienti con insufficienza mitralica rispetto ai controlli e che i livelli di TNF- $\alpha$  aumentavano con la classe funzionale di insufficienza cardiaca (Kapadia et al., 2000).

Uno studio successivo condotto su pazienti affetti da insufficienza mitralica cronica prima della riparazione chirurgica ha evidenziato livelli significativamente

più elevati ai test ELISA di TNF- $\alpha$  ed IL-6 rispetto ai controlli e un aumento dei livelli delle citochine al peggiorare della classe funzionale NYHA. In questo studio è stata osservata anche correlazione tra i livelli di TNF- $\alpha$  e pressione polmonare, volume telediastolico e volume sistolico del ventricolo sinistro (Oral et al., 2003). Nessuna correlazione è stata dimostrata tra livelli di IL-6 e pressione polmonare e volumi ventricolari (Oral et al., 2003).

Queste differenze nei risultati possono corrispondere a diversità di specie nella patogenesi della malattia valvolare mitralica o a una differenza tra espressione genica periferica ed espressione genica a livello di cardiomiociti delle citochine: alcuni studi hanno infatti dimostrato una sovraespressione di queste citochine a livello di cardiomiociti nell'uomo, nel gatto e nel cane (Kapadia et al., 1997; Qing et al., 2003; Paslawska et al., 2006)

I risultati del presente studio concordano invece con i pochi studi condotti nel cane. Recchia et al, (2000) non hanno evidenziato aumento delle concentrazioni sieriche di TNF- $\alpha$  e IL-6 in cani con insufficienza cardiaca indotta mediante pacing. Zois et al, 2011 hanno recentemente pubblicato uno studio in cui sono state valutate le concentrazioni sieriche di varie citochine utilizzando un kit ELISA del commercio differente da quello utilizzando nel presente studio: non è stato possibile effettuare alcuna valutazione sui livelli sierici di IL-6 e TNF- $\alpha$  in quanto la prima non era quantificabile in oltre il 75% dei soggetti inclusi e il secondo non è stato quantificato in alcun soggetto incluso nello studio.

Il limite di rilevabilità del kit impiegato ha rappresentato un problema anche nell'interpretazione dei risultati del presente studio. TNF- $\alpha$  non era quantificabile nel 60% dei cani inclusi e IL-6 nel 75% dei cani inclusi. Questo può essere attribuito alle concentrazioni circolanti molto basse di queste due citochine, ma rappresenta un importante fattore limitante nell'interpretazione dei risultati a cui si è cercato di ovviare con un'analisi statistica appropriata.

Un altro limite dello studio è rappresentato dal numero ridotto di animali arruolati. Occorre però notare che i criteri di inclusione erano molto rigidi al fine di eliminare, o ridurre al minimo, la presenza di fattori in grado di influenzare i risultati. Le citochine sono proteine a basso peso molecolare secrete dalle cellule



in risposta a vari stimoli, con funzione di mediatori di reazioni immunitarie e infiammatorie: in particolare IL-6 e TNF- $\alpha$  sono annoverate tra le citochine proinfiammatorie e possono essere coinvolte in molteplici processi biologici. Un aumento dei loro livelli accompagna molti processi neoplastici, patologie renali ed epatiche croniche e diverse condizioni infiammatorie e autoimmunitarie (Damas et al., 1997; Dinarello, 1997; Carrero et al., 2009; Keystone & Ware, 2010; Hamilton et al., 2011; Grivennikov et al., 2011; Mihara et al., 2012; Solís-Herruzo et al., 2011). Seguendo i criteri di inclusione di pazienti in vari studi dello stesso tipo in campo umano, si è deciso di escludere dallo studio i cani affetti da malattia degenerativa mitralica e concomitanti segni clinici e/o alterazioni ematologiche/biochimiche compatibili con patologie epato-renali, malattie infiammatorie, infettive o neoplastiche (Aukrust et al., 1998; Dibbs et al., 1999; Kell et al., 2002).

E' stato inoltre osservato in diversi studi condotti nell'uomo che la terapia medica e chirurgica modificano i livelli circolanti di citochine, da cui la scelta di non arruolare soggetti già in terapia cardiologica (Stenvinkel et al., 1999; Gurlek et al., 2001; Ohtsuka et al., 2001).

Nonostante queste limitazioni, il mancato rilievo di differenze statisticamente significative tra i gruppi, e la presenza di una marcata variabilità tra individui nell'ambito dei diversi gruppi, è possibile sottolineare alcuni aspetti:

- TNF- $\alpha$  e IL-6 sono state quantificate con frequenza maggiore nei cani affetti da malattia valvolare mitralica che nei cani di controllo (TNF- $\alpha$ : 44,4 VS 16,6%, rispettivamente; IL-6: 29,6 vs 0%, rispettivamente);
- Livelli relativamente più elevati di IL-6 sono stati osservati in classe 1;
- Livelli relativamente più elevati di TNF- $\alpha$  nelle classi più avanzate, in particolare in classe 2 e 4.

Sebbene i risultati del presente studio non supportino pienamente un ruolo di TNF- $\alpha$  e IL-6 nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca conseguente a malattia valvolare mitralica, suggeriscono comunque la presenza di uno stato infiammatorio nei cani con malattia valvolare mitralica, almeno in una parte di questi o probabilmente di entità diversa. Pertanto, un ruolo di queste citochine

nella patogenesi della malattia valvolare mitralica non può essere completamente escluso.

Le piccole differenze nei livelli delle citochine circolanti tra le diverse classi possono essere solo frutto del caso, stante il numero ridotto di cani per classe, tuttavia il riscontro di livelli relativamente più elevati di TNF- $\alpha$  in classe 2 può essere correlato all'inizio dei processi di rimodellamento cardiaco e in classe 4 può essere interpretato anche in relazione all'implicazione del TNF- $\alpha$  nella cachessia cardiaca. TNF- $\alpha$  ha effetti su proteolisi, altera il metabolismo dei lipidi, determina atrofia muscolare con perdita di peso (Sharma & Anker, 2002).

La produzione di TNF- $\alpha$  è stimolata dal sovraccarico volumetrico e dallo stiramento miocardio ed a sua volta il TNF- $\alpha$  contribuisce al deterioramento della funzione cardiaca esercitando un effetto inotropo negativo ed alterando la sensibilità dei recettori adrenergici attraverso induzione del sistema dell'ossido nitrico sintetasi (Kapadia et al, 1997; Deswal et al, 2001; Oikonomou et al, 2011). Inoltre, provoca dilatazione ventricolare inducendo apoptosi dei cardiomiociti e variazione nella composizione del collagene anche attraverso l'attivazione delle metalloproteinasi di matrice implicate nella patogenesi del rimodellamento nell'uomo e nel cane (Spinale et al., 2000; 2002; Haudek et al., 2007).

Il riscontro di livelli relativamente più elevati di IL-6 nella classe 1 non trova riscontro nella bibliografia disponibile e non è spiegabile se non per effetto della variabilità individuale, della ridotta dimensione campionaria e del caso.

## **Conclusioni**

L'attivazione immuno-infiammatoria svolge un ruolo importante in corso di insufficienza cardiaca cronica nell'uomo. In questo studio, i livelli circolanti di TNF- $\alpha$  e IL-6 misurati mediante la tecnica ELISA non sono risultati statisticamente correlati con la gravità dell'insufficienza cardiaca contrariamente a quanto osservato nell'uomo. Tuttavia, TNF- $\alpha$  ed IL-6 sono rilevabili con maggiore frequenza nei cani affetti da malattia valvolare mitralica che nei controlli. Questi dati suggeriscono uno stato infiammatorio nei cani con malattia valvolare mitralica, sebbene con una certa variabilità individuale e, pertanto, un ruolo delle citochine nella patogenesi della malattia valvolare mitralica non può essere completamente escluso.

## STUDIO 2

Obiettivo di questo studio è stato valutare il potenziale ruolo di IL-1, IL-6, IL-8, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca conseguente a malattia valvolare mitralica mediante:

- Misurazione dell'espressione genica di IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  nelle cellule mononucleate di pazienti sani e affetti da patologia mitralica mediante RT-PCR;
- Valutazione dell'esistenza di associazioni tra i livelli circolanti di tali citochine e parametri ecocardiografici di funzione ventricolare sinistra e rimodellamento cardiaco.

## MATERIALI E METODI

### **Animali**

Cani di proprietà sottoposti a visita cardiologica specialistica presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) del Dipartimento di Salute Animale dell'Università degli studi di Parma nel periodo gennaio 2009 – luglio 2010 sono stati arruolati in modo prospettico nello studio previo consenso informato del proprietario. Le visite cardiologiche specialistiche effettuate presso la suddetta struttura universitaria includono la raccolta dell'anamnesi remota e recente, il segnalamento, l'esecuzione di un elettrocardiogramma in 6-derivazioni (standard e unipolari toraciche), dell'esame radiografico del torace in due proiezioni (latero-laterale destra e dorso-ventrale), dell'esame ecocardiografico ed ecoDoppler ed il prelievo di un campione di sangue venoso per esami di laboratorio.

I soggetti arruolati dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione:

- Visita cardiologia specialistica effettuata dallo stesso medico veterinario (AM);

- Esame radiografico effettuato presso l'Unità Operativa di Diagnostica per Immagini dell'OVUD dell'Università degli studi di Parma;
- Cani di razza e incroci;
- Cani di entrambi i sessi;
- Età  $\geq 5$  anni;
- Peso compreso tra 5 e 20 kg;
- Soggetti esenti da cardiopatie congenite o acquisite diverse da malattia valvolare mitralica cronica (MVMC);
- Soggetti con anamnesi muta per malattie infettive o neoplasie in atto o recenti (meno di 1 anno), malattie infiammatorie croniche, insufficienza renale acuta e cronica, patologie del tessuto connettivo, febbre;
- Soggetti con pressione arteriosa sistolica sistemica misurata con flussimetria Doppler  $< 160$  mmHg;
- Soggetti con valori emato-chimici nel range di normalità del laboratorio utilizzato (Laboratorio di ematologia e biochimica-clinica della Sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Salute Animale dell'Università degli studi di Parma);
- Soggetti non in terapia cardiologica al momento dell'inclusione.

Cani che soddisfacevano i suddetti criteri, ma risultati esenti da MVMC, sottoposti a visita cardiologica specialistica preventiva in quanto a rischio di sviluppare malattia valvolare mitralica o in ambito di visita preanestesiologica in soggetti da sottoporre a ovarioisterectomia o castrazione non terapeutiche, sono stati arruolati come controlli.

### **Raccolta dei dati clinici e classificazione dei cani**

I cani arruolati sono stati allocati a diverse classi funzionali di insufficienza cardiaca sulla base dei rilievi clinici, radiografici, ed ecocardiografici.

### ***Sintomi e segni clinici***

Sono stati valutati tolleranza all'esercizio fisico, stato del sensorio, appetito, tosse, tachipnea, sforzo respiratorio, dispnea notturna, sincopi e body condition score (BCS). A queste variabili è stato attribuito un punteggio secondo quanto riportato nella tabella 1. I cani inclusi, per essere considerati asintomatici, dovevano presentare punteggio 1 nei parametri sincope, stato del sensorio, tachipnea, dispnea, sforzo respiratorio; punteggio 1 o 2 nei parametri tolleranza all'esercizio fisico, appetito, tosse; punteggio  $\geq 3$  per il BCS.

### ***Esame radiografico***

E' stata valutata e caratterizzata con punteggio clinico la presenza di edema polmonare (tabella 2).

### ***Esame elettrocardiografico***

L'esame elettrocardiografico è stato effettuato utilizzando un elettrocardiografo Cardioline plus a tre canali, su soggetto contenuto in decubito laterale destro e sono stati annotati per ciascun cane la frequenza cardiaca, il ritmo di base e le eventuali aritmie presenti.

### ***Esame ecocardiografico***

L'esame ecocardiografico è stato effettuato su soggetti non sedati, contenuti in decubito laterale destro e sinistro su apposito tavolo per ecocardiografia, utilizzando un apparecchio Megas CPV (Esaote Biomedica) montante sonde elettroniche phased-array con frequenze variabili da 2,5 a 7,5 MHz a seconda della taglia dell'animale e del tipo di valutazione ecocardiografica da effettuare.

L'esame ecocardiografico è stato eseguito per via transtoracica secondo gli standard utilizzando proiezioni parasternali destre, sinistre e la proiezione retrosternale (Thomas et al., 1993). In particolare, per gli obiettivi di questo studio la valutazione ecocardiografica ha incluso:

Proiezione parasternale destra asse corto:

- M-mode del ventricolo sinistro;
- Diametro aorta e diametro atrio sinistro con ratio atrio sinistro/aorta aorta (Hägström et al., 1994);
- Doppler del flusso polmonare.

Proiezione parasternale destra asse lungo 4-camere:

- Valutazione morfologica dell'apparato valvolare mitralico.

Proiezione parasternale sinistra apicale 4-camere:

- Valutazione morfologica dell'apparato valvolare mitralico e tricuspide;
- Color mapping dell'eventuale rigurgito mitralico;
- Doppler continuo del rigurgito mitralico;
- Flusso diastolico transmitralico.

Proiezione parasternale sinistra craniale asse corto ottimizzata per la valvola tricuspide:

- Valutazione morfologica dell'apparato tricuspide;
- Doppler continuo dell'eventuale rigurgito tricuspide.

Proiezione retrosternale:

- Doppler del flusso aortico.

Ai fini della successiva allocazione dei cani inclusi nello studio alle diverse classi funzionali di insufficienza cardiaca e della valutazione statistica sono stati in particolare estrapolati parametri ecocardiografici collegati alla funzione ventricolare sinistra, al rimodellamento cardiaco e alla gravità della malattia valvolare mitralica:

- Rapporto atrio sinistra/aorta;
- Rapporto E/A e velocità di picco onda E del flusso transmitralico;
- Diametro del ventricolo sinistro in telediastole e parametri correlati:
  - Valore normalizzato secondo Cornell ( $VDd/\text{peso corporeo}^{0,294}$ ) (Cornell et al., 2004);
- Diametro del ventricolo sinistro in sistole e parametri correlati:

- Valore normalizzato secondo Cornell (VDs/peso corporeo<sup>0,315</sup>) (Cornell et al., 2004);
- Frazione di accorciamento;
- Frazione di eiezione;
- Presenza o assenza di ipertensione polmonare sulla base della velocità del rigurgito tricuspideale (normale se  $\leq 2,8$  m/sec) (Schober & Baade, 2006; Johnson, 2006; Kullum & Stepien, 2007).

### **Classificazione dei cani**

E' stata utilizzata la classificazione indicata nelle linee guida per la diagnosi e il trattamento della malattia valvolare cronica del cane dell'ACVIM Consensus Statement (tabella 8) (Atkins et al., 2009). I cani sono stati allocati alle diverse classi sulla base dei sintomi, del quadro radiografico e dei parametri ecocardiografici.

<b>SANI</b>	Cani clinicamente sani, senza soffio cardiaco e con esame ecocardiografico nella norma
<b>CLASSE B1</b>	Cani asintomatici, con soffio cardiaco, con anomalie strutturali indicative della presenza di malattia ed insufficienza mitralica emodinamicamente insignificante (no segni di rimodellamento cardiaco, ovvero di ingrandimento delle camere cardiache)
<b>CLASSE B2</b>	Cani asintomatici, con soffio cardiaco, con anomalie strutturali indicative della presenza di malattia ed insufficienza mitralica emodinamicamente significativa (segni di rimodellamento cardiaco, ovvero di ingrandimento delle camere cardiache)
<b>CLASSE C</b>	Cani con soffio cardiaco, anomalie strutturali e sintomi e segni clinici di insufficienza cardiaca

**Tabella 8:** Classificazione ACVIM di insufficienza cardiaca nei cani con malattia valvolare mitralica (Atkins et al., 2009).

### **Raccolta dei campioni da sangue**

In ambito di visita cardiologica specialistica effettuata presso l'OVUD viene di routine prelevato un campione di sangue venoso, su soggetti a digiuno da almeno



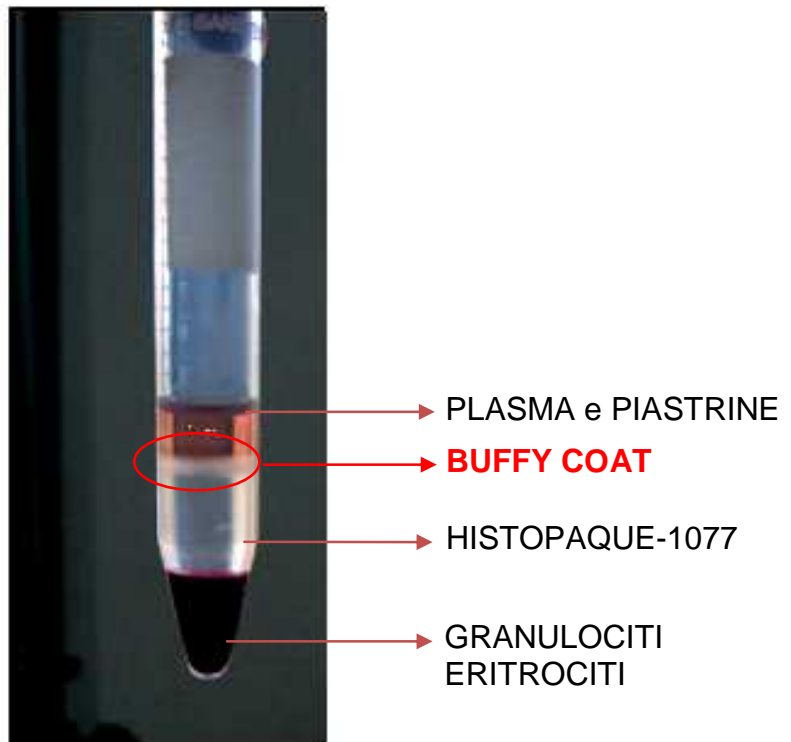
12 ore, e raccolto in una provetta contenente EDTA e una provetta contenente litio eparina come anticoagulanti. Sul campione di sangue vengono effettuati i seguenti esami di laboratorio: esame emocromocitometrico con formula leucocitaria, urea, creatinina, bilirubina totale, GPT, gamma-GT, fosfatasi alcalina, proteine totali, albumine, globuline, rapporto albumine/globuline, colesterolo, trigliceridi, sodio, potassio, cloro, rapporto sodio/potassio, calcio, fosforo.

Sui cani arruolati e che, come tali, dovevano presentare valori agli esami sopra elencati entro i range di normalità del laboratorio di riferimento, successivamente all'inclusione nello studio e comunque entro 72 ore dalla visita cardiologica specialistica e dall'ottenimento del consenso informato del proprietario, è stato effettuato un ulteriore prelievo di 3 ml di sangue venoso.

### **Isolamento delle PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)**

Il prelievo di sangue, effettuato dalla vena giugulare e raccolto in provetta con litio-eparina, è stato utilizzato per l'isolamento delle cellule mononucleate (PBMC: linfociti e monociti) mediante l'utilizzo di *Histopaque*<sup>®</sup>-1077 (Sigma). *Histopaque*<sup>®</sup>-1077 è una soluzione a base di polisaccarosio (5.7%) e diatrizoato di sodio (9.0%) corretti ad una densità di  $1.077 \pm 0.001$  g/ml che assicura un rapido recupero delle cellule mononucleate vitali anche da ridotti volumi di sangue.

Un volume di sangue in anticoagulante viene stratificato su un uguale volume di soluzione *Histopaque*<sup>®</sup>-1077 e sottoposto a centrifugazione; grazie alla formazione di un gradiente di densità si ottiene una separazione delle componenti cellulari e acellulari contenute nel sangue. In particolare il polisaccarosio favorisce l'aggregazione di eritrociti e granulociti e la loro successiva sedimentazione rapida. I linfociti ed i monociti sono invece trattenuti all'interfaccia tra la soluzione *Histopaque*<sup>®</sup>-1077 ed il plasma a formare un anello opalescente di cellule (*buffy coat*) (Figura 3).



**Figura 3:** Fasi derivanti dalla separazione mediante centrifugazione in gradiente di densità (soluzione *Histopaque*<sup>®</sup>-1077) di un campione di sangue periferico. È evidenziato l'anello opalescente costituito dalle cellule mononucleate periferiche (*buffy coat*).

Due ml di sangue di ciascun animale sono stati quindi stratificati su un uguale volume di *Histopaque*<sup>®</sup>-1077 (a temperatura ambiente). I campioni sono sottoposti a centrifugazione a 420xg (1800 rpm) per 30 minuti al fine di ottenere la separazione delle tre fasi.

Al termine della centrifugazione, le cellule mononucleate (*buffy coat*) presenti all'interfaccia tra la fase di plasma e di soluzione *Histopaque*<sup>®</sup>-1077 vengono prelevate mediante aspirazione con pipetta Pasteur sterile e trasferite in una provetta sterile.

Vengono quindi effettuati 2 lavaggi con 7/8 ml di *phosphate buffer solution* (PBS) sterile per diluire ed eliminare dai PBMC così isolati la soluzione

*Histopaque*<sup>®</sup>-1077, il plasma ed eventuali detriti prelevati, centrifugando a 320xg (1600 rpm) per 5 minuti. Al termine della seconda centrifugazione i PBMC vengono congelati in terreno RPMI-1640 [L-glutamina 20 µM, penicillina 1 U/ml, streptomina 1 µg/ml (Analitica de Mori), fungizone 2.5 µg/ml (Sigma), amminoacidi non essenziali 1x (Euroclone), 2-β-mercaptoetanololo 50 µM (Gibco)] addizionato di 50% FCS e 10% DMSO e conservati a -80°C dopo congelamento lento in isopropanolo (Mr. Frosty<sup>®</sup>, Nunc).

### **Estrazione di RNA**

L'estrazione dell'RNA totale dai PBMC è condotta utilizzando il kit TRI-Reagent<sup>®</sup> (Ambion) (1ml di TRI-Reagent/10<sup>7</sup> cells) che combina fenolo e guanidina tiocianato in una soluzione monobasica che rapidamente inibisce l'attività delle RNasi.

I PBMC sono stati scongelati e centrifugati per 8' a 1800rpm, dopo aver eliminato il medium al pellet di cellule è stato aggiunto 1 ml di TRI-Reagent. Dopo aver risospeso le cellule varie volte, il lisato ottenuto è stato incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Sono stati quindi aggiunti 100µl di 1-Bromo 3-Cloro propano (BCP), l'omogenato è stato agitato vigorosamente ed è stato lasciato a temperatura ambiente per 12 minuti.

Successivamente è stato centrifugato a 12000 x g per 12 minuti a 4°C. Al termine della centrifugazione è possibile osservare nella provetta tre fasi ben distinte: una fase superiore acquosa incolore contenente l'RNA, l'interfase biancastra dove rimane il DNA, e una fase inferiore organica di colore rosso contenente proteine, polisaccaridi, acidi grassi e detriti cellulari.

La fase incolore è stata trasferita in un'altra provetta a cui sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo; dopo averli vortexati ed incubati per 8 minuti a temperatura ambiente i campioni sono stati centrifugati a 12000 x g a 4°C per 8 minuti.

Al termine della centrifugazione è stato eliminato il surnatante e al pellet è stato aggiunto 1 ml di etanolo freddo 75%. Dopo centrifugazione a 7500 x g a 4°C

per 5 minuti le provette sono state poste in ghiaccio, è stato eliminato il surnatante e il pellet è stato lasciato asciugare per 5-10 minuti.

L'RNA è stato quindi risospeso in un'appropriata quantità di acqua DEPC (DiEtilPiroCarbonato) e la sua concentrazione è stata quantificata mediante spettrofotometro (GENEQUANT pro®, Amersham Pharmacia, UK), tramite il quale è stato valutato anche il rapporto di assorbanza a 260/280 nm. Per il dosaggio 5 µl di campione sono stati diluiti in 65 µl di acqua DEPC.

### **Retrotrascrizione dell'RNA**

La retrotrascrizione dell'mRNA in cDNA è stata effettuata utilizzando il kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystem). Un'aliquota pari ad 1µg di RNA totale è stata risospesa in acqua DEPC per un totale di 16µl; a questi sono stati aggiunti 4 µl della Master Mix (contenente l'enzima trascrittasi inversa) e la miscela è stata sottoposta alla seguente sequenza di fasi in un termociclatore: 5 minuti a 25°C per permettere l'appaiamento dei primers con le sequenze complementari presenti sull'mRNA (annealing), 30 minuti a 42°C per favorire la reazione di polimerizzazione condotta dalla trascrittasi inversa, 5 minuti a 85°C per ottenere la denaturazione dell'enzima e la terminazione del ciclo di retrotrascrizione. Il campione è stato poi conservato a -20°C.

### **Reazione a catena della polimerasi (PCR)**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica che viene usata *in vitro* per produrre grandi quantità di una determinata sequenza di DNA a doppio filamento. Essa sfrutta alcune peculiarità del meccanismo di duplicazione del DNA, in particolare la capacità della DNA polimerasi di usare un DNA a filamento singolo come stampo per la sintesi di un nuovo filamento complementare. La PCR è una tecnica analitica di tipo qualitativo e semi-quantitativo.

E' stata preparata una miscela contenente 2 µl del cDNA ottenuto, Taq Polymerase buffer (Fermentas), MgCl<sub>2</sub> 2 mM (Fermentas), dNTPs 0,2 mM (Invitrogen), primers 2,5µM (Fig 7), 0,05U/µl di Taq Polymerase (Fermentas) ed H<sub>2</sub>O DEPC fino ad un volume finale di 25 µl.

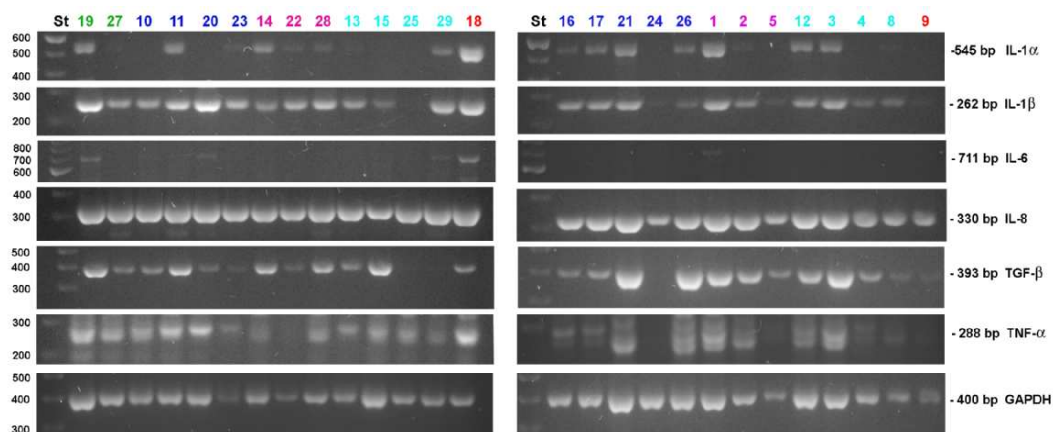
Per l'amplificazione di tutti i geni presi in esame, la miscela di reazione è stata sottoposta a 94°C per 3' prima di iniziare i cicli di amplificazione (Figura 5) e dopo ad una fase finale di estensione a 72°C per 10'. I cicli di amplificazione per TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL-8 sono stati condotti a 94°C per 1', 50°C per 1' e 72°C per 1'; per il TGF- $\beta$  sono stati condotti 94°C per 1', 60°C per 2' e 72°C per 1'; per IL-6 e GAPDH sono stati condotti 94°C per 1', 50°C per 1'30'' e 72°C per 2'.

Gene	Sequenza	Amplicone
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	S: 5'-TTGGAAGACCTGAAGAACTGTTAC-3'	545 bp
	A: 5'-GTTTTTGAGATTCTTAGAGTCAC -3'	
<b>IL1<math>\beta</math></b>	S: 5'-CACAGTTCTCTGGTAGATGAGG -3'	262 bp
	A: 5'-TGGCTTATGTCCTGTA ACTTGC -3'	
<b>IL-6</b>	S: 5'-CTATGAACTCCCTCTCCACAA -3'	711 bp
	A: 5'-TGCCCAGTGGACAGGTTTCT -3'	
<b>IL-8</b>	S: 5'-AGGGATCCTGTGTAAACATGACTTCC -3'	330 bp
	A: 5'-GGAATTCACGGATCTTGTTTCTC -3'	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	A: 5'-TTCCTGCTCCTCATGGCCAC -3'	393bp
	A: 5'-GCAGGAGCGCACGATCATGT -3'	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	S: 5'-CTCTTCTGCCTGCTGCAC -3'	288 bp
	A: 5'-GCCCTTGAAGAGGACCTG -3'	
<b>GAPDH</b>	S: 5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT -3'	400 bp
	A: 5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	

**Figura 5:** Primers utilizzati (Hegemann N., 2003) nella reazione di PCR con rispettive T di annealing e lunghezze dell'amplicone ottenuto.

### Rivelazione dei prodotti di PCR: elettroforesi di DNA su gel di agarosio

Per la rivelazione degli amplificati, 10  $\mu$ l di ciascun campione ottenuto come precedentemente descritto, sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio al 2% in tampone TBE 1X contenente Sybr Green (Invitrogen); per avere l'indicazione dei pesi molecolari degli ampliconi, quindi per verificare la corretta riuscita della reazione di PCR, sono stati caricati 3  $\mu$ l di TrackIt DNA ladder 100bp (Invitrogen) come standard. La corsa è stata effettuata in tampone TBE 1X per 3h a 30-50V ed i prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante l'utilizzo di un transilluminatore a raggi UV e fotografati (Figura 6). La densità di ciascuna banda è stata quantificata eseguendo una analisi densitometrica con il programma Scion Image (Scion Capture Driver 1.2 for Image-Pro Plus, Scion Corp., MA, USA). Il livello di espressione di ciascuna citochina è stato normalizzato con il corrispondente valore di GAPDH ed i risultati sono espressi in unità arbitrarie relative (RAU).



**Figura 6:** Prodotti di PCR delle citochine.

La misurazione dell'espressione genica delle citochine su sangue periferico è stata effettuata presso il Laboratorio di Immunologia della Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria del Dipartimento di Salute Animale dell'Università degli studi di Parma.

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando un software per statistica commerciale (R Development Core Team. R foundation for Statistical Computing, 2011). I risultati della statistica descrittiva sono riportati come media, mediana e range interquartile. Il confronto tra i gruppi relativamente ai valori di citochine è stato effettuato utilizzando il test Kruskal-Wallis per variabili continue. Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. Lo studio delle associazioni con i parametri ecocardiografici è stato effettuato utilizzando la regressione lineare.



## **Risultati**

Sono stati inclusi nello studio 29 cani, di cui 23 affetti da malattia valvolare mitralica. Sei cani sani sono stati usati come controllo (Classe Sani). Dei 23 cani affetti da MVM, 6 sono stati allocati alla classe B1, 8 alla classe B2, 9 alla classe C. Nella tabella 9 sono riportate le caratteristiche segnaletiche, cliniche, elettrocardiografiche e radiografiche dei cani inclusi. Nella tabella 10 sono riportate i dati ecocardiografici dei cani inclusi.

Lo studio ha arruolato 10 femmine e 19 maschi, con un'età mediana di 12 anni (range interquartile IQR: 10-12) e peso corporeo mediano di 11,3 kg (IQR 8,3 – 14,2).

Nella tabella 11 sono riportati i valori di IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  rilevati nei cani dello studio.

Nella tabella 12 sono mostrati i valori descrittivi relativi alla elaborazione statistica delle variabili ecocardiografiche e della espressione genica delle citochine nelle varie classi di insufficienza cardiaca.

Razza	ACVIM	Sesso	Età (anni)	kg	BSA	Episodi sincopali	Tolleranza esercizio	Sensorio	Appetito	Episodi di tachipnea	Sforzo respiratorio	Tosse	Dispnea notturna	BC S	Edema polmonare	Aritmie	FC
Incrocio	B1	FS	10	11	0,49	1	1	1	2	1	1	1	1	4	1	NA	105
Incrocio	B1	M	8	8,3	0,41	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	105
Incrocio	B1	FS	12	14,2	0,59	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	AVCs	150
Incrocio	B1	M	12	12,3	0,53	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Incrocio	B1	FS	9	7,25	0,37	1	1	1	2	1	1	2	1	3	1	NA	120
Incrocio	B1	M	14	13	0,55	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	120
Incrocio	B2	MC	12	18,7	0,67	1	1	1	1	2	1	2	1	5	1	NA	90
Incrocio	B2	M	9	18	0,69	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	150
Incrocio	B2	M	8	7,1	0,37	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Incrocio	B2	M	12	5,45	0,31	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	AVCs	120
Incrocio	B2	M	9	17,5	0,74	1	1	1	2	1	1	2	2	3	1	NA	120
Incrocio	B2	MC	12	15	0,61	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Barbone	B2	FS	12	6,1	0,32	2	1	1	2	1	1	1	1	4	1	NA	120
Incrocio	B2	M	10	12,7	0,49	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	150
Incrocio	C	MC	9	11,3	0,5	2	2	1	2	2	2	3	1	4	1	NA	210
Incrocio	C	FS	13	10,8	0,49	2	2	1	3	2	3	2	1	4	2	VPCs	210
Yorkshire	C	M	10	5,4	0,31	2	2	1	3	2	2	1	1	3	2	NA	165
Incrocio	C	MC	12	8,6	0,42	1	2	2	2	2	1	3	2	3	2	AVCs + VPCs	120
Incrocio	C	FS	9	15,2	0,61	1	2	1	2	2	2	4	2	3	3	NA	150
Incrocio	C	MC	10	13,1	0,56	1	2	1	2	1	1	3	2	2	2	AVCs	170
Incrocio	C	FS	12	17	0,66	2	2	1	1	2	1	3	2	4	2	AVCs	120
Incrocio	C	M	17	16,6	0,65	1	3	1	2	3	2	4	3	4	3	AVCs	180
Incrocio	C	M	11	13	0,55	2	4	2	4	2	2	1	1	1	2	FA	190
Westie	Sano	M	7	11	0,49	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Cocker	Sano	FS	10	8	0,4	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	120
Yorkshire	Sano	M	12	6,5	0,35	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	120
Incrocio	Sano	FS	13	12,5	0,54	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90
Incrocio	Sano	FS	10	9,7	0,45	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	105
Incrocio	Sano	M	14	8,3	0,41	1	1	1	2	1	1	1	1	3	1	NA	90

**Tabella 9:** Segnalamento, punteggio dei sintomi clinici, dei segni radiografici e reperti elettrocardiografici dei cani inclusi nello studio. Legenda: F= femmina; FS= femmina sterilizzata; M= maschio; MC= maschio castrato; BSA=body surface area; BCS=body condition score; NA= non accertata, soggetto in ritmo sinusale

Razza	ACVIM	Sesso	Età (anni)	kg	BSA	DVSd	DVSd Cornell	DVSs	DVSs Cornell	AS/AO	FA	FE m-mode	E/A	Picco E	PHT
Incrocio	B1	FS	10	11	0,49	3,64	1,80	2,34	1,10	1,45	36	66	0,94	0,3	NO
Incrocio	B1	M	8	8,3	0,41	3,1	1,66	1,51	0,78	1,34	51	84	0,99	0,76	SI
Incrocio	B1	FS	12	14,2	0,59	3,95	1,81	2,08	0,90	1,37	47	79	0,99	0,86	NO
Incrocio	B1	M	12	12,3	0,53	3,85	1,84	2,34	1,06	1,07	39	70	0,82	0,2	NO
Incrocio	B1	FS	9	7,25	0,37	2,37	1,32	1,16	0,62	1,35	30	59	1,44	0,82	NO
Incrocio	B1	M	14	13	0,55	3,6	1,69	2,3	1,03	1,3	36	67	1,06	0,75	NO
Incrocio	B2	MC	12	18,7	0,67	4,44	1,88	2,57	1,02	1,36	42	73	1,05	0,99	NO
Incrocio	B2	M	9	18	0,69	5,16	2,20	2,84	1,14	1,73	45	76	1,28	1,33	NO
Incrocio	B2	M	8	7,1	0,37	3,78	2,12	1,94	1,05	1,48	49	81	0,86	0,63	NO
Incrocio	B2	M	12	5,45	0,31	3,62	2,19	1,87	1,10	1,33	48	81	1,26	0,83	NO
Incrocio	B2	M	9	17,5	0,74	4,92	2,12	3,15	1,28	1,47	36	65	0,97	1,01	NO
Incrocio	B2	MC	12	15	0,61	4,44	2,00	2,4	1,02	1,91	46	77	1,47	0,78	NO
Barbone	B2	FS	12	6,1	0,32	3,42	2,01	1,73	0,98	1,38	50	82	0,93	0,7	NO
Incrocio	B2	M	10	12,7	0,49	4,75	2,25	2,45	1,10	2,2	48	80	2,1	1,22	SI
Incrocio	C	MC	9	11,3	0,5	4,68	2,29	2,32	1,08	2,83	50	82	1,27	1,49	SI
Incrocio	C	FS	13	10,8	0,49	3,67	1,82	1,87	0,88	2,35	49	81	1,71	1,18	SI
Yorkshire	C	M	10	5,4	0,31	3,87	2,36	2,24	1,32	1,89	42	74	1,7	1,14	SI
Incrocio	C	MC	12	8,6	0,42	4,46	2,37	2,63	1,34	2,09	41	72	1,42	1,11	NO
Incrocio	C	FS	9	15,2	0,61	5,12	2,30	2,8	1,19	1,72	45	76	1,19	1,36	NO
Incrocio	C	MC	10	13,1	0,56	5,71	2,68	3,4	1,51	2,52	40	70	2,24	1,61	SI
Incrocio	C	FS	12	17	0,66	4,75	2,07	2,44	1,00	2,02	49	80	1,44	1,76	NO
Incrocio	C	M	17	16,6	0,65	4,44	1,94	2,53	1,04	1,93	43	74	2	1,3	SI
Incrocio	C	M	11	13	0,55	5,55	2,6	3,29	1,47	2,37	41	71	NA	1,86	SI
Westie	Sano	M	7	11	0,49	3,42	1,69	1,84	0,86	1,12	46	79	0,94	0,65	NO
Cocker	Sano	FS	10	8	0,4	2,38	1,29	1,8	0,94	1,28	51	24	0,92	0,59	NO
Yorkshire	Sano	M	12	6,5	0,35	2,81	1,62	1,3	0,72	1,54	54	86	0,74	0,52	NO
Incrocio	Sano	FS	13	12,5	0,54	3,6	1,71	2,3	1,04	1,3	36	67	1,06	0,75	NO
Incrocio	Sano	FS	10	9,7	0,45	2,34	1,20	1,58	0,77	1,24	32	63	0,88	0,58	NO
Incrocio	Sano	M	14	8,3	0,41	2,78	1,49	1,9	0,98	1,08	32	62	2,05	0,85	NO

**Tabella 10:** Segnalamento e dati ecocardiografici dei cani inclusi nello studio. Legenda: F= femmina; FS= femmina sterilizzata; M= maschio; MC= maschio castrato; BSA=body surface area; BCS=body condition score; DVSd= diametro ventricolo sinistro in diastole; DVSs=diametro ventricolo sinistro in sistole; EDVI= indice di volume telediastolico; ESVI=indice di volume sistolic; FA=frazione di accorciamento; FE=frazione di eiezione; PHT=ipertensione polmonare; NA= non accertata.

Razza	ACVI M	Sesso	Età (anni)	kg	BSA	IL- 1 $\alpha$ /GAPDH	IL- 1 $\beta$ /GAPDH	IL- 6/GAPDH	IL- 8/GAPDH	TGF- $\beta$ /GAPDH	TNF- $\alpha$ /GAPDH
Incrocio	B1	FS	10	11	0,49	0	0,531	0	1,632	0,463	0,619
Incrocio	B1	M	8	8,3	0,41	0,469	0,741	0,047	1,435	0,913	0,835
Incrocio	B1	FS	12	14,2	0,59	0,206	0,952	0	1,505	0,305	0,625
Incrocio	B1	M	12	12,3	0,53	0	1,147	0,161	1,566	0,175	1,015
Incrocio	B1	FS	9	7,25	0,37	0,55	0,78	0	1,177	1,144	0,999
Incrocio	B1	M	14	13	0,55	0	0,06	0	0,698	0	0
Incrocio	B2	MC	12	18,7	0,67	0,347	0,222	0	1,178	1,353	0,686
Incrocio	B2	M	9	18	0,69	1,037	1,047	0,16	1,209	0,928	1,123
Incrocio	B2	M	8	7,1	0,37	0,437	0,957	0	1,483	0,386	0,459
Incrocio	B2	M	12	5,45	0,31	0,1	0,71	0	1,791	1,039	1,201
Incrocio	B2	M	9	17,5	0,74	0	0,239	0	2,257	0,676	0,249
Incrocio	B2	MC	12	15	0,61	0,621	0,463	0,079	1,966	1,148	0,2
Barbone	B2	FS	12	6,1	0,32	0,154	0,9	0	2	1,021	0,544
Incrocio	B2	M	10	12,7	0,49	0,535	0,914	0	1,311	1,14	1,318
Incrocio	C	MC	9	11,3	0,5	0	0,457	0	1,364	0,561	0,296
Incrocio	C	FS	13	10,8	0,49	0,131	0,992	0	2,268	0,244	0,446
Yorkshire	C	M	10	5,4	0,31	0,472	0,618	0	1,126	0,617	0,502
Incrocio	C	MC	12	8,6	0,42	0,053	0,757	0	2,684	0,634	0,634
Incrocio	C	FS	9	15,2	0,61	0	0,137	0	1,08	1,006	0,391
Incrocio	C	MC	10	13,1	0,56	0	0	0	2,066	0	0,622
Incrocio	C	FS	12	17	0,66	0,413	1,102	0,169	2,263	0	0,295
Incrocio	C	M	17	16,6	0,65	0	0,239	0	2,68	0,177	0
Incrocio	C	M	11	13	0,55	2,231	1,464	1,038	2,183	0,572	1,817
Westie	Sano	M	7	11	0,49	0,464	0,778	0,183	1,036	0,777	0,775
Cocker	Sano	FS	10	8	0,4	0,029	0,399	0	1,231	0,273	0,592
Yorkshire	Sano	M	12	6,5	0,35	0	1,113	0,058	1,032	0,175	0,48
Incrocio	Sano	FS	13	12,5	0,54	0,121	0,06	0	0,698	0	0,523
Incrocio	Sano	FS	10	9,7	0,45	0	0	0	0,256	0	0,488
Incrocio	Sano	M	14	8,3	0,41	0,469	0,741	0,047	1,034	0,514	0,635

**Tabella 11:** Espressione genica delle citochine dai PBMC.

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>Peso (kg)</b>	SANO	6	6.500	8.075	9.333	2.182	9.000	10.675	12.500
	B1	6	7.250	8.975	11.008	2.731	11.650	12.825	14.200
	B2	8	5.450	6.850	12.569	5.603	13.850	17.625	18.700
	C	9	5.400	10.800	12.333	3.786	13.000	15.200	17.000
<b>p = 0.40818</b>	Tutti	29	5.400	8.300	11.503	3.966	11.300	14.200	18.700

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>BSA</b>	SANO	6	0.350	0.402	0.440	0.068	0.430	0.480	0.540
	B1	6	0.370	0.430	0.490	0.085	0.510	0.545	0.590
	B2	8	0.310	0.358	0.525	0.175	0.550	0.675	0.740
	C	9	0.310	0.490	0.528	0.113	0.550	0.610	0.660
<b>p = 0.43454</b>	Tutti	29	0.310	0.410	0.501	0.121	0.490	0.590	0.740

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>DVSd</b>	SANO	6	2.340	2.480	2.888	0.523	2.795	3.268	3.600
	B1	6	2.370	3.225	3.418	0.592	3.620	3.798	3.950
	B2	8	3.420	3.740	4.316	0.640	4.440	4.793	5.160
	C	9	3.670	4.440	4.694	0.689	4.680	5.120	5.710
<b>p = 0.00060586</b>	Tutti	29	2.340	3.420	3.952	0.932	3.850	4.680	5.710

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>DVSd Cornell</b>	SANO	6	1.200	1.342	1.501	0.214	1.556	1.673	1.713
	B1	6	1.324	1.671	1.689	0.192	1.746	1.808	1.841
	B2	8	1.877	2.008	2.099	0.126	2.123	2.201	2.250
	C	9	1.823	2.065	2.272	0.285	2.300	2.369	2.680
<b>p &lt; 0.0001</b>	Tutti	29	1.200	1.694	1.944	0.373	1.944	2.206	2.680

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>DVSs</b>	SANO	6	1.300	1.635	1.787	0.334	1.820	1.885	2.300
	B1	6	1.160	1.653	1.955	0.502	2.190	2.330	2.340
	B2	8	1.730	1.923	2.369	0.496	2.425	2.637	3.150
	C	9	1.870	2.320	2.613	0.491	2.530	2.800	3.400
<b>p = 0.011771</b>	Tutti	29	1.160	1.870	2.239	0.553	2.300	2.530	3.400

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>DVSs Cornell</b>	SANO	6	0.721	0.795	0.884	0.122	0.900	0.965	1.038
	B1	6	0.622	0.807	0.914	0.186	0.964	1.052	1.099
	B2	8	0.979	1.022	1.086	0.094	1.071	1.111	1.279
	C	9	0.884	1.044	1.203	0.218	1.188	1.335	1.512
<b>p = 0.009078</b>	Tutti	29	0.622	0.935	1.045	0.206	1.038	1.100	1.512

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>EDVI M-mode</b>	SANO	6	42.030	54.710	73.990	24.276	77.965	94.920	98.450
	B1	6	53.640	93.980	98.900	24.575	105.730	115.147	119.950
	B2	8	127.140	146.488	166.564	27.698	167.285	179.888	216.080
	C	9	115.660	158.700	200.466	57.271	203.610	215.660	289.160
<b>p = 0.0001198</b>	Tutti	29	42.030	98.450	143.932	63.233	137.650	185.220	289.160

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>ESVI M-mode</b>	SANO	6	11.360	16.718	21.900	7.789	22.545	26.182	32.780
	B1	6	15.040	21.783	27.770	9.128	28.380	34.828	38.260
	B2	8	26.290	32.832	39.335	10.048	38.305	43.920	58.490
	C	9	21.810	35.340	50.504	21.784	48.160	60.310	85.970
<b>p = 0.0066513</b>	Tutti	29	11.360	24.300	36.801	17.714	33.150	43.710	85.970

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>AS/AO</b>	SANO	6	1.080	1.150	1.260	0.163	1.260	1.295	1.540
	B1	6	1.070	1.310	1.313	0.129	1.345	1.365	1.450
	B2	8	1.330	1.375	1.607	0.312	1.475	1.775	2.200
	C	9	1.720	1.930	2.191	0.352	2.090	2.370	2.830
<b>p = 0.00017062</b>	Tutti	29	1.070	1.330	1.656	0.468	1.470	1.930	2.830

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>FA</b>	SANO	6	32.000	33.000	41.833	9.766	41.000	49.750	54.000
	B1	6	30.000	36.000	39.833	7.782	37.500	45.000	51.000
	B2	8	36.000	44.250	45.500	4.598	47.000	48.250	50.000
	C	9	40.000	41.000	44.444	3.941	43.000	49.000	50.000
<b>p = 0.53467</b>	Tutti	29	30.000	39.000	43.241	6.512	45.000	49.000	54.000

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>FE M-mode</b>	SANO	6	51.000	62.250	68.000	12.617	65.000	76.000	86.000
	B1	6	59.000	66.250	70.833	9.152	68.500	76.750	84.000
	B2	8	65.000	75.250	76.875	5.693	78.500	81.000	82.000
	C	9	70.000	72.000	75.556	4.475	74.000	80.000	82.000
<b>p = 0.25994</b>	Tutti	29	51.000	67.000	73.379	8.356	74.000	80.000	86.000

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>E/A</b>	SANO	6	0.740	0.890	1.098	0.478	0.930	1.030	2.050
	B1	6	0.820	0.952	1.040	0.212	0.990	1.042	1.440
	B2	8	0.860	0.960	1.240	0.404	1.155	1.327	2.100
	C	8	1.190	1.382	1.621	0.363	1.570	1.782	2.240
<b>p = 0.026985</b>	Tutti	28	0.740	0.940	1.276	0.427	1.125	1.448	2.240



Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>Picco E</b>	SANO	6	0.520	0.582	0.657	0.123	0.620	0.725	0.850
	B1	6	0.200	0.412	0.615	0.287	0.755	0.805	0.860
	B2	8	0.630	0.760	0.936	0.248	0.910	1.062	1.330
	C	9	1.110	1.180	1.423	0.274	1.360	1.610	1.860
<b>p = 0.00030537</b>	Tutti	29	0.200	0.700	0.963	0.411	0.850	1.220	1.860

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>FC</b>	SANO	6	90.000	90.000	102.500	14.748	97.500	116.250	120.000
	B1	6	90.000	105.000	115.000	20.494	112.500	120.000	150.000
	B2	8	90.000	90.000	116.250	25.036	120.000	127.500	150.000
	C	9	120.000	150.000	168.333	33.727	170.000	190.000	210.000
<b>p = 0.0026243</b>	Tutti	29	90.000	105.000	129.310	36.492	120.000	150.000	210.000

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>IL-1<math>\alpha</math>/GAPDH</b>	SANO	6	0.000	0.007	0.180	0.226	0.075	0.378	0.469
	B1	6	0.000	0.000	0.204	0.251	0.103	0.403	0.550
	B2	8	0.000	0.140	0.404	0.335	0.392	0.556	1.037
	C	9	0.000	0.000	0.367	0.723	0.053	0.413	2.231
<b>P = 0.45232</b>	Tutti	29	0.000	0.000	0.305	0.455	0.131	0.469	2.231

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>IL-1<math>\beta</math>/GAPDH</b>	SANO	6	0.000	0.145	0.515	0.439	0.570	0.769	1.113
	B1	6	0.060	0.584	0.702	0.377	0.760	0.909	1.147
	B2	8	0.222	0.407	0.682	0.331	0.805	0.925	1.047
	C	9	0.000	0.239	0.641	0.486	0.618	0.992	1.464
<b>P = 0.82876</b>	Tutti	29	0.000	0.239	0.639	0.399	0.741	0.952	1.464

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>IL-6/GAPDH</b>	SANO	6	0.000	0.000	0.048	0.071	0.024	0.055	0.183
	B1	6	0.000	0.000	0.035	0.065	0.000	0.035	0.161
	B2	8	0.000	0.000	0.030	0.059	0.000	0.020	0.160
	C	9	0.000	0.000	0.134	0.344	0.000	0.000	1.038
<b>P = 0.82439</b>	Tutti	29	0.000	0.000	0.067	0.196	0.000	0.047	1.038

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>IL-8/GAPDH</b>	SANO	6	0.256	0.782	0.881	0.351	1.033	1.036	1.231
	B1	6	0.698	1.242	1.335	0.350	1.470	1.551	1.632
	B2	8	1.178	1.285	1.649	0.409	1.637	1.974	2.257
	C	9	1.080	1.364	1.968	0.624	2.183	2.268	2.684
<b>p = 0.0048716</b>	Tutti	29	0.256	1.126	1.524	0.601	1.435	2.000	2.684

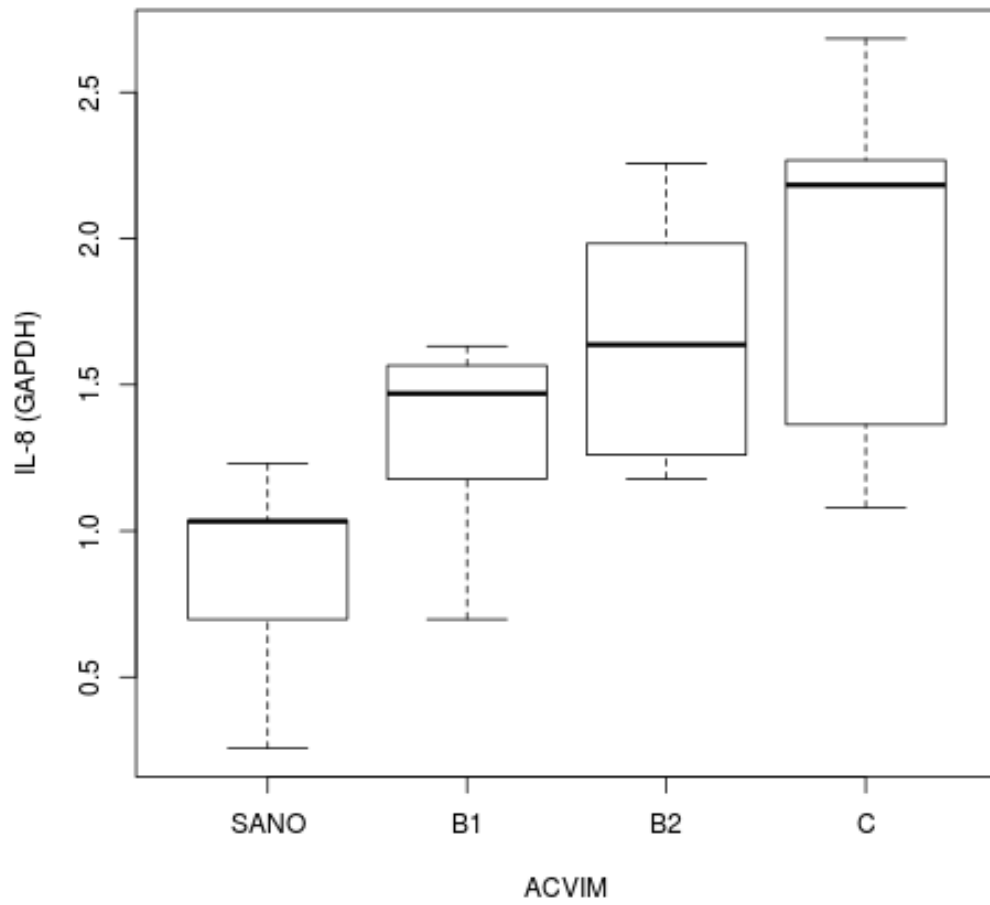
Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>TGF-<math>\beta</math>/GAPDH</b>	SANO	6	0.000	0.044	0.290	0.306	0.224	0.454	0.777
	B1	6	0.000	0.207	0.500	0.443	0.384	0.800	1.144
	B2	8	0.386	0.865	0.961	0.303	1.030	1.142	1.353
	C	9	0.000	0.177	0.423	0.338	0.561	0.617	1.006
<b>p = 0.012293</b>	Tutti	29	0.000	0.177	0.560	0.419	0.561	0.928	1.353

Variabile	Classe	n	Min	Primo quartile	Media	DS	Mediana	Terzo quartile	Max
<b>TNF-<math>\alpha</math>/GAPDH</b>	SANO	6	0.480	0.497	0.582	0.112	0.558	0.624	0.775
	B1	6	0.000	0.620	0.682	0.376	0.730	0.958	1.015
	B2	8	0.200	0.406	0.722	0.438	0.615	1.143	1.318
	C	9	0.000	0.296	0.556	0.511	0.446	0.622	1.817
<b>p = 0.49721</b>	Tutti	29	0.000	0.446	0.633	0.394	0.592	0.775	1.817

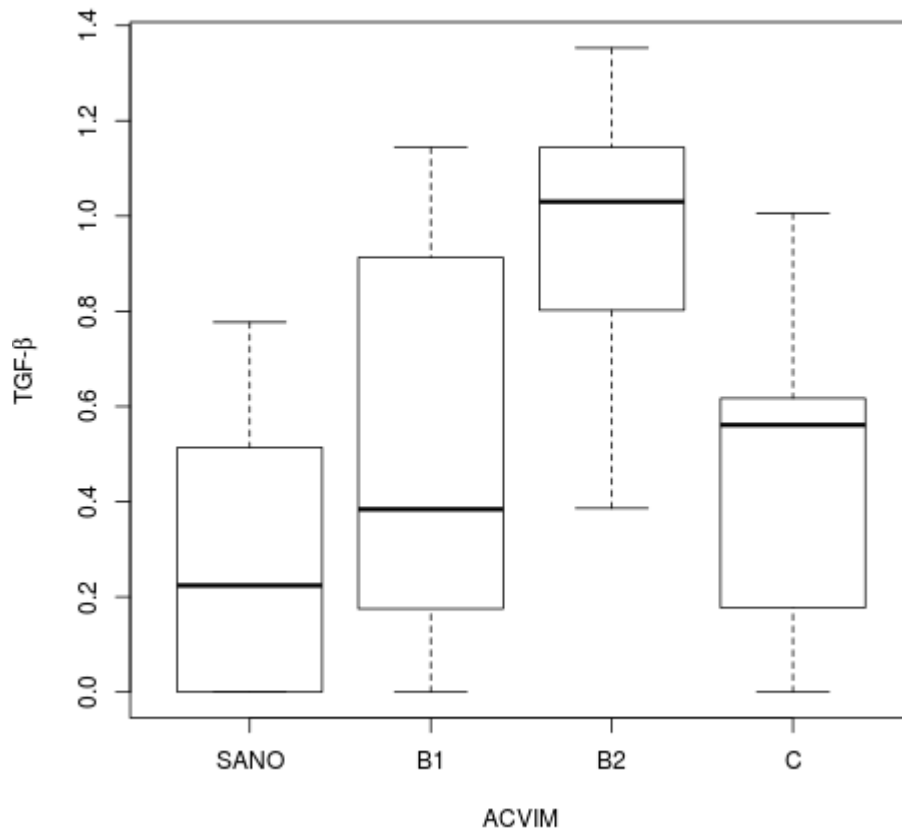
**Tabella 12:** Statistica descrittiva dei parametri ecocardiografici e dell'espressione genica delle citochine nella varie classi di insufficienza cardiaca. Il valore di p è stato calcolato utilizzando il test Kruskal-Wallis. In grassetto i valori di p statisticamente significativi.

Legenda: DVSD= diametro ventricolo sinistro in diastole; DVSS=diametro ventricolo sinistro in sistole; EDVI=indice di volume telediastolico; ESVI=indice di volume telesistolico; FA=frazione di accorciamento; FE=frazione di eiezione

Differenze significative ( $P < 0,05$ ) tra i gruppi sono state rilevate per il diametro del ventricolo sinistro in diastole (DVSd) e parametri correlati (DVSd Cornell ed EDVI), per il diametro del ventricolo sinistro in telesistole (DVSs) e parametri correlati (DVSs Cornell ed ESVI), rapporto E/A e velocità di picco E del flusso transmitralico, frequenza cardiaca (FC), IL-8/GAPDH (Figura 7) e TGF- $\beta$ /GAPDH (Figura 8) . Non sono state osservate differenze significative tra i gruppi per peso corporeo, frazione di accorciamento (FA), frazione di eiezione (FE), IL-1 $\alpha$ /GAPDH, IL-1 $\beta$ /GAPDH, IL-6/GAPDH e TNF- $\alpha$ /GAPDH.

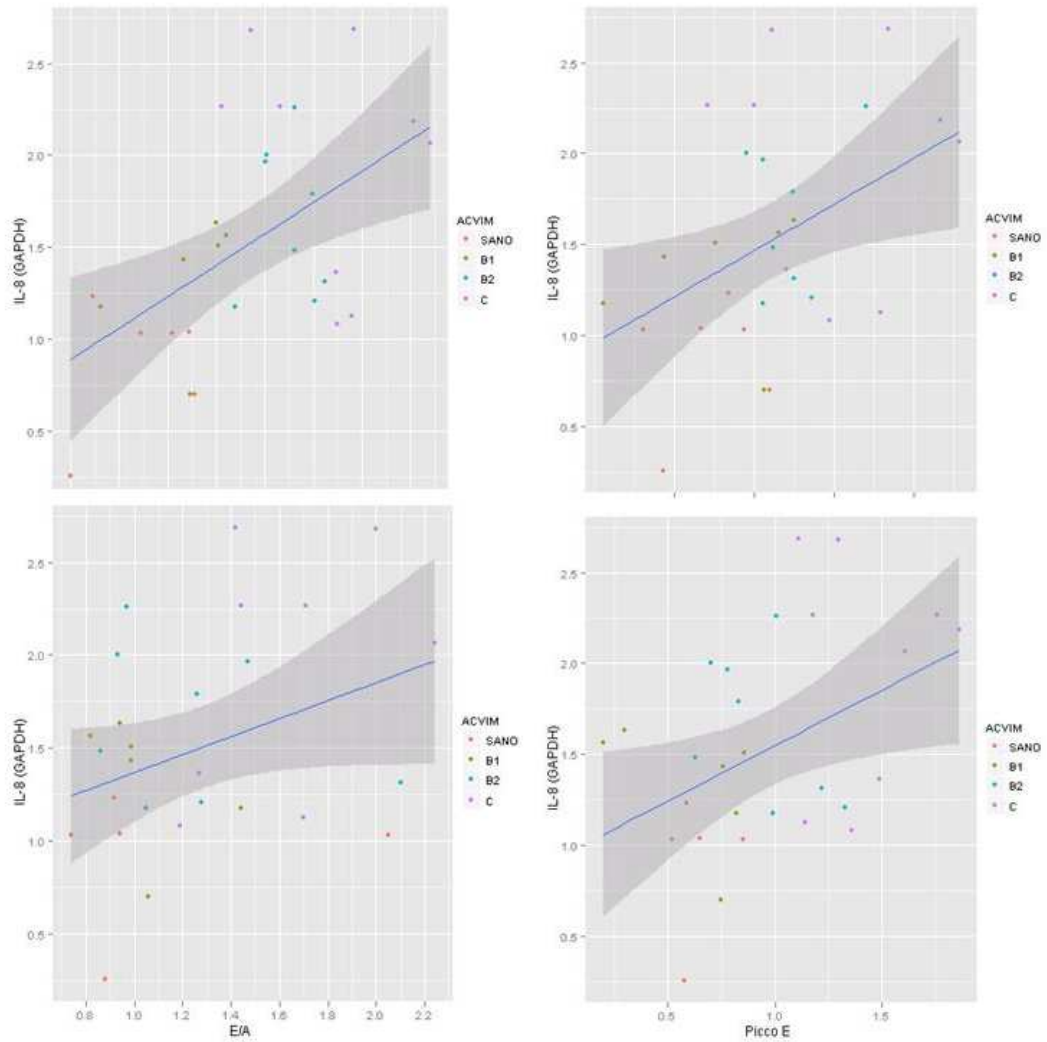


**Figura 7:** Espressione di IL-8 nei cani con insufficienza cardiaca a vario stadio e cani sani.



**Figura 8:** Espressione di TGF- $\beta$  nei cani con insufficienza cardiaca a vario stadio e cani sani.

L'espressione di IL-8 è risultata associata a DVSD Cornell, DVSDs Cornell, rapporto E/A del flusso transmitralico e velocità di picco E del flusso transmitralico (Figg. 9).



**Figura 9:** Linee di regressione ed intervallo di confidenza di IL-8 su diametro del ventricolo sinistro in telediastole Cornell, diametro del ventricolo sinistro in telesistole Cornell, rapporto E/A del flusso transmitralico e velocità di picco E del flusso transmitralico.

Nella Tabella 13 sono riportati i relativi coefficienti di regressione. Non sono state riscontrate associazioni lineari o non lineari tra l'espressione genica della altre citochine e parametri ecocardiografici.

	Stima	Errore standard	Valore t	Pr(>[t])
Intercetta	-0.1369	0.5192	-0.26	0.794
DVSd Cornell	0.8547	0.2625	3.26	0.0030

	Stima	Errore standard	Valore t	Pr(>[t])
Intercetta	0.1950	0.5387	0.36	0.7202
DVSs Cornell	1.2722	0.5062	2.51	0.0182

	Stima	Errore standard	Valore t	Pr(>[t])
Intercetta	0.8831	0.3463	2.55	0.0170
E/A	0.4843	0.2579	1.88	0.0717

	Stima	Errore standard	Valore t	Pr(>[t])
Intercetta	0.9353	0.2672	3.50	0.0016
Picco E	0.6117	0.2559	2.39	0.0241

**Tabella 13:** Coefficienti di regressione per le variabili ecocardiografiche considerate rispetto all'IL-8 dove Stima è la stima del coefficiente di regressione e indica l'incremento nell'IL-8 per l'aumento di una unità della variabile indipendente; Errore standard è una misura dell'incertezza della stima; Pr indica la probabilità di osservare un valore di coefficiente di regressione così estremo o più estremo se non ci fosse relazione lineare tra IL-8 e variabile considerata.



## **Discussione**

Nello studio effettuato, l'espressione genica di IL-8 e TGF- $\beta$  nelle cellule mononucleate è risultata più elevata nei cani affetti da endocardiosi mitralica rispetto ai soggetti sani, con differenze statisticamente significative tra le classi funzionali di insufficienza cardiaca.

In particolare, è stato evidenziato che l'espressione di IL-8 tende ad aumentare con l'avanzamento della classe di gravità, mentre l'espressione del TGF- $\beta$  è particolarmente accresciuta nella classe ACVIM B2, che include cani asintomatici affetti da patologia degenerativa mitralica con segni di rimodellamento cardiaco, per poi abbassarsi nei soggetti sintomatici, ovvero a quelli appartenenti alla classe C, pur rimanendo significativamente differente rispetto alle altre classi.

Al contrario, lo studio non ha messo in evidenza differenze significative nell'espressione genica dell'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  nelle cellule mononucleate tra cani sani e cani affetti da malattia valvolare mitralica cronica e tra le varie classi di insufficienza cardiaca.

Le cellule mononucleate del sangue periferico sono in grado di produrre diverse citochine pro-infiammatorie, come interleuchine, TNF, e fattori di crescita, come il TGF $\beta$ . Diversi studi in campo umano confermano che in corso di infarto miocardico (Fang et al., 2010), di insufficienza cardiaca (Damas et al., 2001; Satoh et al., 2004; Vredevoe et al., 2004) e di patologia coronarica (Libby et al., 2002; Libby 2006) si assiste ad un aumento di espressione delle citochine infiammatorie nelle cellule mononucleate.

In medicina veterinaria, pochi studi hanno valutato l'espressione delle citochine a livello di cellule mononucleate o di tessuto cardiaco. In particolare, alcuni autori hanno evidenziato che, in corso di endocardiosi mitralica, si osserva l'up-regolazione, a livello di tessuto valvolare, di numerose citochine infiammatorie (IL-6, cicloossigenasi, recettori per l'IL-1 e IL-10), di molecole di adesione, del marker infiammatorio amiloide A sierica, dei recettori della serotonina (che è noto essere legata al TGF- $\beta$ ) e di altre molecole associate al

TGF- $\beta$ , ipotizzando un loro coinvolgimento nella patogenesi della patologia degenerativa mitralica (Oyama & Chittur, 2006).

Recentemente è stato pubblicato uno studio sulla valutazione dell'espressione genica di alcuni marker dell'infiammazione dalle cellule mononucleate. Fonfara et al. hanno misurato i livelli di espressione dell'mRNA di IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 in cani sani e affetti da insufficienza cardiaca. Gli autori hanno messo in evidenza che i cani con insufficienza cardiaca presentavano livelli statisticamente più elevati di mRNA di IL-1 $\beta$  e di IL-2 e livelli statisticamente inferiori di TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 3 rispetto ai cani sani. Non hanno, invece, dimostrato differenze statisticamente significative nei livelli di mRNA dell'IL-6, dell'IL-8 e dell'IL-10, del TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 tra i cani sani e quelli malati (Fonfara et al., 2011).

Questi risultati discordano da molti studi pubblicati in campo umano dove il TNF- $\alpha$ , l'IL-6 e l'IL-8 tendono ad aumentare in pazienti con insufficienza cardiaca e dove l'aumento dell'IL-6 è associato a prognosi peggiore (Meurs et al., 2002; Anker and von Haehling, 2004; Chen et al., 2008; von Haehling et al., 2009; Kaur et al., 2009; Tamariz and Hare, 2010).

Anche il presente studio non ha dimostrato differenze significative per quanto riguarda l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 e il TNF- $\alpha$ . Tale discrepanza di risultati tra la medicina umana e quella veterinaria potrebbe essere spiegata se si considera che gli studi effettuati nell'uomo prendono di solito in considerazione pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa o patologia miocardica ischemica, nel corso dei quali la risposta infiammatoria è molto marcata (Fairweather & Rose, 2005; Hansson et al., 2006; Hedayat et al., 2010). La natura, invece, dell'endocardiosi mitralica è molto diversa, essendo una malattia degenerativa dove gli infiltrati infiammatori sono assenti (Abbott, 2008; Olsen et al., 2010).

Contrariamente a quanto pubblicato da Fonfara et al., nel presente studio è stato evidenziato un incremento dell'espressione genica dell'IL-8 nei cani affetti dalla patologia rispetto a quelli sani, che correla con lo stadio di gravità dell'insufficienza cardiaca. Questo risultato è in accordo con quanto riportato in letteratura umana dove è dimostrato un aumento dei livelli di IL-8 in corso di

insufficienza cardiaca (Hermansen et al., 2011) e dove tale incremento si associa a disfunzione endoteliale, deficit della perfusione del tessuto miocardico, apoptosi dei miocardiociti e delle cellule endoteliali e inibizione della contrazione miocitica (Sharma et al., 2000; Dominguez-Rodriguez et al., 2006).

Nel presente studio, l'espressione del TGF- $\beta$  è risultata superiore nelle cellule mononucleate dei cani affetti rispetto a quelli sani e i suoi livelli erano più alti nei pazienti asintomatici con segni di rimodellamento cardiaco (classe ACVIM B2). In medicina umana, l'aumento della sua concentrazione è stato associato a cardiomiopatia ipertrofica, cardiomiopatia dilatativa e patologia ischemica (Khan & Sheppard, 2006) e si pensa che giochi un ruolo importante nella patogenesi della patologia valvolare, della fibrosi miocardica e nell'aritmogenesi, soprattutto della fibrillazione atriale (Border & Noble, 1994; Khan & Sheppard, 2006; Lim & Zhu, 2006). In medicina veterinaria, in accordo con quanto risultato in questo studio, è stato riscontrato l'aumento dell'espressione delle isoforme TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 nel tessuto valvolare di cani affetti da endocardiosi mitralica grave allo stadio terminale (Oyama & Chittur, 2006). Queste osservazioni sono, invece, contrastanti con i risultati dello studio di Fonfara et al. dove è stata evidenziata una riduzione dell'espressione di TGF- $\beta$ 3 nelle cellule mononucleate di cani affetti da scompenso cardiaco rispetto ai soggetti sani (Fonfara et al., 2011). Nel confrontare questi risultati, occorre tuttavia considerare che 6 degli 8 soggetti inclusi nello studio di Fonfara et al. erano affetti da patologie cardiache diverse da malattia valvolare mitralica. La diversa natura ed eventualmente le differenze nella patogenesi delle patologie cardiache prese in considerazione potrebbero spiegare la discrepanza dei risultati. Inoltre, i cani affetti da endocardiosi mitralica inclusi nello stesso studio di Fonfara et al. appartenevano a razze di taglia grande nei quali la patologia mitralica presenta un'evoluzione diversa rispetto ai cani di piccola e media taglia (Kittleson, 1998; Borgarelli et al, 2004).

L'aumento dell'espressione del TGF- $\beta$  riscontrato nei pazienti appartenenti alla classe ACVIM B2 e la successiva diminuzione nei pazienti di classe C, uno stadio di malattia più avanzato, potrebbe indicare il coinvolgimento del sistema del TGF- $\beta$  nella patogenesi della patologia e nel rimodellamento cardiaco durante

le fasi precoci e il successivo intervento di altri tipi di mediatori o di molecole ad attività anti-fibrotica. Infatti, gli studi effettuati in campo veterinario (Aupperle et al., 2008; Obayashi et al., 2011) dimostrano il ruolo delle tre isoforme di TGF- $\beta$  nella patogenesi dell'endocardiosi mitralica nel cane e mettono in evidenza l'esistenza di una relazione tra il TGF- $\beta$  e le cellule interstiziali valvolari (Obayashi et al., 2011), che si pensa siano coinvolte nell'insorgere e nella progressione della patologia mitralica (Oyama e Chittur, 2006). Diversi studi suggeriscono come necessaria un'alterazione del loro fenotipo affinché si sviluppi la degenerazione valvolare e si ipotizza che le isoforme del fattore di crescita trasformante siano tra i potenziali mediatori coinvolti in questo processo, anche se il loro contributo rimane poco chiaro (Weber et al., 1994; Rizvi et al., 1996; Mow et al., 1999; Olsen et al., 2003; Rabkin et al., 2001; Aupperle et al., 2008; Disartian et al., 2008; Aupperle et al., 2009; Obayashi et al., 2011). Si pensa, inoltre, che giochino un ruolo importante nei processi di fibrosi e rimodellamento cardiaco attraverso il meccanismo di transizione endoteliale-mesenchimale (Zeisberg et al., 2007; Obayashi et al., 2011).

Lo studio delle correlazioni tra i livelli di citochine e i parametri ecocardiografici di rimodellamento e funzione cardiaca mediante regressione lineare hanno evidenziato una relazione statisticamente significativa con DVSD Cornell, DVSDsCornell, rapporto E/A e velocità di picco E del flusso transmitralico per IL-8. Non sono state osservate correlazioni significative, lineari o non lineari, per alcuna delle altre citochine analizzate.

Ciò suggerisce l'esistenza di una associazione tra grado di ingrandimento del ventricolo sinistro, funzione sistolica del ventricolo sinistro e pressioni di riempimento diastoliche del ventricolo sinistro ed espressione di IL-8 nel sangue periferico nei cani con malattia valvolare mitralica. Nell'uomo, elevati livelli circolanti di IL-8 sono stati associati principalmente a danno miocardico su base ischemica e, nel cane, è stata osservata una maggiore espressione di IL-8 dopo ischemia e riperfusione (Kukielka et al., 1995; Sharma et al., 2000; Dominguez-Rodriguez et al., 2006).

Sulla base delle evidenze bibliografiche e di quanto emerso da questo studio, la produzione di IL-8 potrebbe essere stimolata dall'ipertrofia eccentrica e/o dallo stiramento miocardico che accompagnano il sovraccarico volumetrico cronico e potrebbe suggerire un ruolo del danno ischemico miocardico nella progressione della disfunzione sistolica e diastolica che accompagna il decorso della patologia, sia come stimolo alla produzione di IL-8 che come frutto degli effetti dannosi esercitati dalla citochina stessa. Vari studi hanno messo in luce, infatti, la possibilità che l'IL-8 possa aumentare l'espressione della sintetasi inducibile dell'ossido nitrico, incrementare la produzione di elevate quantità di radicali dell'ossido nitrico, produrre matrice extracellulare e forme interstiziali di collagene provocando disfunzione endoteliale, deficit della riserva vascolare coronarica e della perfusione del tessuto miocardico, apoptosi dei miocardiociti e delle cellule endoteliali, e, infine, citotossicità e/o inibizione della contrazione miocitica (Sharma et al., 2000; Dominguez-Rodriguez et al., 2006).

Un limite dello studio è rappresentato dal numero ridotto di animali arruolati. Tuttavia, sapendo che i livelli delle citochine pro-infiammatorie aumentano in corso di molte patologie, quali malattie infiammatorie e autoimmunitarie, processi neoplastici, patologie renali ed epatiche, i criteri di inclusione utilizzati per questo studio sono stati molto rigidi in modo da eliminare o ridurre al minimo la presenza di fattori in grado di influenzare i risultati. (Damas et al., 1997; Dinarello, 1997; Carrero JJ et al., 2009; Keystone EC & Ware CF, 2010; Hamilton MJ et al., 2011; Grivennikov SI et al., 2011; Solís-Herruzo JA et al., 2011; Mihara M et al., 2012). Per l'arruolamento dei cani sono stati utilizzati i criteri di inclusione usati in campo umano per lo stesso tipo di studio e si è deciso di escludere i cani affetti da malattia degenerativa mitralica e concomitanti segni clinici e/o alterazioni ematologiche/biochimiche compatibili con patologie epato-renali, malattie infiammatorie, infettive o neoplastiche (Aukrust P et al., 1998; Dibbs Z et al., 1999; Kell R et al., 2002). Infine, sono stati esclusi i soggetti che erano già in trattamento cardiologico alla prima visita per evitare che la terapia in atto potesse influire con i risultati, come già dimostrato in campo umano (Stenvinkel et al., 1999; Gurlek et al., 2001; Ohtsuka et al., 2001).

## **Conclusioni**

Gli studi in medicina umana dimostrano, attraverso il rilievo di un aumento dell'espressione genica delle citochine infiammatorie, il ruolo importante dei mediatori dell'infiammazione nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca. Il presente studio ha messo in evidenza che l'espressione di IL-8 e TGF- $\beta$  è maggiore nei soggetti affetti da endocardiosi mitralica rispetto ai soggetti sani indicando un loro coinvolgimento nella patogenesi, nei processi di rimodellamento e nell'evoluzione di questa patologia. Il fatto che l'IL-8 tenda ad aumentare con il progredire della classe di gravità della malattia, mentre il TGF- $\beta$  è più elevato nelle fasi precoci della patologia, suggerisce un loro coinvolgimento fisiopatologico in fasi diverse della malattia. A differenza di quanto riportato in letteratura umana, non sono state evidenziate differenze significative nell'espressione genica dell'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . tra cani sani e cani affetti da malattia valvolare mitralica: questo può corrispondere a una diversa attivazione del sistema delle citochine in relazione alla natura della patologia cardiaca.

### 3- BIBLIOGRAFIA

1. Abbott J. Acquired valvular disease. In: Tilley L, Smith F Jr, Oyama M, Sleeper M. *Manual of Canine and Feline Cardiology*. Fourth Ed. St Louis – Missouri:Saunders Elsevier, 2008.
2. Adamopoulos S, Parissis J, Kremastinos D. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001; 3(5):517–26.
3. Anker SD, Chua TP, Swan JW, Ponikowski P, Harrington D, Swan JW, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJS. Hormonal changes and catabolic / anabolic imbalance in chronic heart failure: the importance of cardiac cachexia. *Circulation* 1997; 96:526–34.
4. Anker SD, Egerer KR, Volk HD, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 1997; 79:1426–1430.
5. Anker SD, Sharma R. The syndrome of cardiac cachexia. *IntJ Cardiol* 2002; 85: 51-66.
6. Anker SD, Von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart* 2004; 90: 464-470.
7. Arndt J, Reynolds CA, Singletary GE, Connolly JM, Oyama MA. Serum serotonin concentration in dogs with degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 2009; 23 (6): 1208-1213.
8. Aronson D, Burger AJ. Effect of beta-blockade on autonomic modulation of heart rate and neurohormonal profile in decompensated heart failure. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2001; 6:98–106.
9. Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, Hamlin R, Keene B, Luis- Fuentes V, Stepien R. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med* 2009;23:1142-1150.
10. Atkins CD, Keene BW, Brown WA, et al. Results of the veterinary enalapril trial to prove reduction in onset of heart failure in dogs chronically

treated with enalapril alone for compensated, naturally occurring mitral valve insufficiency, *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 1061-1069.

11. Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Müller F, Andreassen AK, Nordøy I, Aass H, Espevik T, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1999; 83:376–382.
12. Aukrust P, Ueland T, Muller F, Andreassen AK, Nordøy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L. Elevated circulating levels of C–C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 97:1136–1143.
13. Aupperle H, Thielebein J, Kiefer B, März I, Dinges G, Schoon HA. An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. *Vet J* 2009; 180(1):88-94.
14. Aupperle H, Marz I, Thielebein J, Schoon HA. Expression of transforming growth factor  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 in normal and diseased canine mitral valves. *J Comp Path* 2008; 139:97-107.
15. Bernay F, Bland JM, Haggstrom J, Baduel L, Combes B, Lopez A, Kaltssatos V. Efficacy of Spironolactone on survival in dogs with naturally occurring mitral regurgitation caused by myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 2010;24:331–341
16. Boon J. Acquired Valvular Disease In: Boon Veterinary Echocardiography. Second Ed. Wiley- Blackwell, 2011.
17. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286–1292.
18. Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, Santilli A, Chiavegato D, Poggi M, Bellino C, La Rosa G, Zanatta R, Häggstrom J, Tarducci A. Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med* 2008;22:120-128.



19. Borgarelli M, Zini E, D'Agnolo G, Tarducci A, Santilli RA, Chiavegato D, Tursi M, Prunotto M, Häggström J. Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. *J Vet Cardiol* 2004; 6(2):27-34.
20. Boswood A. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. *J Vet Cardiol* 2009; 11: 523-532.
21. Bozkurt B, Mann DL, Deswal A. Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Fail Rev* 2010; 15: 331-341.
22. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008; 358:2148–2159.
23. Buchanan JW. Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 1977;21:75-106
24. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp* 2009; 57: 165-176.
25. Carrero JJ, Park SH, Axelsson J, Lindholm B, Stenvinkel P. Cytokines, Atherogenesis, and Hypercatabolism in Chronic Kidney Disease: A Dreadful Triad. *Semin Dial.* 2009; 22(4): 381-6
26. Chen K, Mehta JL, Li D, Joseph L, Joseph J. Transforming growth factor- $\beta$  receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res* 2004; 95: 1167–1173.
27. Chrysohoou C, Pitsavos C, Barbetseas J, Kotroyiannis I, Brili S, Vasiliadou K, Papadimitriou L, Stefanadis C. Chronic systemic inflammation accompanies impaired ventricular diastolic function, detected by Doppler imaging, in patients with newly diagnosed systolic heart failure (Hellenic Heart Failure Study). *Heart Vessels*; 2009; 24: 22-26.
28. Cornell C.C., Kittleson M.D., Della Torre P., Häggström J., Lombard C.W., Pedersen H.D. Vollmar A., Wey A.: Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Inter Med* 2004;18:311-321
29. Damas P, Canivet JL, de Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont, P, Lamy M. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med* 1997; 25(3): 405–412

30. Damas JK, Gullestad L, Aass H, Simonsen S, Fjeld JG, Wikeby L, Ueland T, Eiken HG, Frøland SS, Aukrust P. Enhanced gene expression of chemokines and their corresponding receptors in mononuclear blood cells in chronic heart failure--modulatory effect of intravenous immunoglobulin. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(1):187-93.
31. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, White BG, Mann DL. Effects of vesnarinone on peripheral circulating levels of cytokines and cytokine receptors in patients with heart failure: a report from the Vesnarinone Trial. *Chest* 2001; 120:453–459.
32. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 2001; 103:2055–2059
33. Dibbs Z, Thornby J, White BG, Mann DL. Natural variability of circulating levels of cytokines and cytokine receptors in patients with heart failure: implications for clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:1935–1942.
34. Dinarello CA. Interleukin -1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011; 117 (14): 3720-3732.
35. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112: 321–329
36. Disatian S, Ehrhart III, Zimmerman S, Orton EC. Interstitial cells from dogs with naturally occurring myxomatous mitral valve disease undergo phenotype transformation. *J Heart Valve Dis* 2008; 17(4): 402-412.
37. Disatian S. Myxomatous degenerative mitral valve disease:An update. *Thai J Vet Med* 2010;40 (2): 151-157.
38. Diwan A, Dibbs Z, Nemoto S, DeFreitas G, Carabello BA, Sivasubramanian N, Wilson EM, Spinale FG, Mann DL. Targeted overexpression of noncleavable and secreted forms of tumor necrosis factor provokes disparate cardiac phenotypes. *Circulation* 2004; 109: 262-268.

39. Dixon DL, Griggs KM, Bersten AD, De Pasquale CG. Systemic inflammation and cell activation reflects morbidity in chronic heart failure. Article in press. *Cytokine* 2011. Doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.029
40. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M, Ferrer J. Prognostic value of interleukin-8 as a predictor of heart failure in patients with myocardial infarction and percutaneous intervention. *Int J Cardiol* 2006; 111: 158-160.
41. Dunlay SM, Weston SA, Redfield MM, Killian JM, Roger VL. Tumor necrosis factor-alpha and mortality in heart failure:a community study. *Circulation* 2008; 118:625–631.
42. Dutka DP, Elborn JS, Delamere F, Shale DJ, Morris GK. Tumour necrosis factor alpha in severe congestive cardiac failure. *Br Heart J* 1993; 70: 141-143.
43. Eghbali M. Cellular origin and distribution of transforming growth factor-beta in the normal rat myocardium. *Cell Tissue Res* 1989; 256: 553–558.
44. Ettinger j. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of veterinary internal medicine - Diseases of the dog and cat*. Seventh ed. St. Louis - Missouri: Saunders Elsevier, 2010.
45. Facker M. Is tumor necrosis factor an important neurohormonal mechanism in chronic heart failure? *Circulation* 1995;92:1379–82.
46. Fairweather D, Rose NR. Inflammatory heart disease: a role for cytokines. *Lupus* 2005;14:646-651
47. Falk T, Jonsson L, Olsen LH, Pedersen HD. Arteriosclerotic changes in the myocardium, lung and kidney in dogs with chronic congestive heart failure and myxomatous mitral valve disease. *Cardiovascular Pathology* 2006; 15: 185-193.
48. Fang L, Du XJ, Gao XM, Dart AM. Activation of peripheral blood mononuclear cells and extracellular matrix and inflammatory gene profile in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 2010; 119(4):175-83.

49. Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi K, Kubota T, You Li Y, McTiernan C. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:537–44.
50. Fenghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* 1997; 2: 12-26.
51. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A, Cassani G, Visioli O. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 1995; 92:1479–1486.
52. Ferrari R. Interleukin-6: a neurohumoral predictor of prognosis in patients with heart failure: light and shadow. *Eur Heart J* 2002; 23:9–10.
53. Ferrari R. Tumor necrosis factor in CHF: a double facet cytokine. *Cardiovasc Res* 1998;37:54–559.
54. Filippatos G, Tsilias K, Venetsanou K. Leptin serum levels in cachectic heart failure patients. Relationship with tumor necrosis factor- $\alpha$  system. *Int J Cardiol* 2000;76:117–22.
55. Fonfara S, Tew S, Clegg P, Dukes-Mc Ewan J. Cytokine and metalloproteinase expression in blood samples of dogs with congestive heart failure. In: *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine Forum, Anaheim, California, 2010.*
56. Frantz S, Ducharme A, Sawyer D, Rohde LE, Kobzik L, Fukazawa R, Allen DTH, Lee RT, Kelly RA. Targeted deletion of caspase-1 reduces early mortality and left ventricular dilatation following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 685-694.
57. Frantz S, Hu K, Bayer B, Gerondakis S, Strotmann J, Adamek A, Ertl G, Bauersachs J. Absence of NF- $\kappa$ B subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *FASEB J.* 2006; 20: 1918-1920.
58. Freeman LM, Rush JE, Kehayias JJ, Ross JN Jr, Meydani SN, Brown DJ, Dolnikowski GG, Marmor BN, White ME, Dinarello CA, Roubenoff R. Nutritional alterations and the effect of fish oil supplementation in dogs with heart failure. *J Vet Intern Med* 1998; 12 (6): 440-8.

59. Gage JR, Fonarow G, Hamilton M, Widawski M, Martinez-Maza O, Vredevoe DL. Beta blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy is associated with decreased Th1/Th2 cytokine ratios and inflammatory cytokine production in patients with chronic heart failure. *Neuroimmunomodulation* 2004; 11:173–180.
60. Ganz T. Hepcidin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 251-254.
61. Gray MO, Long SC, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocytes hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 352–363.
62. Grivennikov SI, Karin M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann Rheum Dis.* 2011;70 (Suppl 1): 104-8.
63. Gurlek A, Kilickap M, Dincer I, Dandachi R, Tutkak H, Oral D. Effect of losartan on circulating TNFalpha levels and left ventricular systolic performance in patients with heart failure. *J Cardiovasc Risk* 2001; 8:279–282.
64. Häggström J, Hansson K, Karlberg BE, Kvarn C, Hollson K. Plasma concentration of atrial natriuretic peptides in relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles Spaniel. *Am J Vet Res* 1994;55:698-703
65. Hamilton MJ, Snapper SB, Blumberg RS. Update on biologic pathways in inflammatory bowel disease and their therapeutic relevance. *J Gastroenterol* 2012 doi: 10.1007/s00535-011-0521-8
66. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:297-239
67. Hao J, Wang B, Jones SC, Jassal DS, Dixon IMC. Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: 3020–3030.

68. Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, Mann DL. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *J Clin Invest* 2007; 117: 2692-2701.
69. Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, Rezaei N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart Fail Rev* 2010; 15:543-562.
70. Hegemann N, Wondimu A, Ullrich K, Schmidt MFG. Synovial MMP-3 and TIMP-1 levels and their correlation with cytokine expression in canine rheumatoid arthritis. *Veterinary Immunology and immunopathology* 2003;91:199-204
71. Hegewisch S, Weh HJ, Hossfeld DK. TNF-induced cardiomyopathy. *Lancet* 1990;2:294–5.
72. Hermansen SE, Kalstad T, How OJ, Myrnes T. Inflammation and reduced endothelial function in the course of severe acute heart failure. *Translational Research* 2011; 157 (3): 117-127.
73. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95:1532–1541.
74. Januzzi JL Jr, Peacock WF, Maisel AS, Chae CU, Jesse RL, Baggish AL, O'Donoghue M, Sakhuja R, Chen AA, van Kimmenade RRJ, Lewandrowski KB, Lloyd-Jones DM, Wu AHB. Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:607–613.
75. Johnson L, Boon J., Orton EC. Clinical characteristics of 53 dogs with Doppler-derived evidence of pulmonary hypertension. *J Vet Inter Med* 1999;13:440-447

76. Jougasaki M, Leskinen H, Larsen AM, Luchnerb A, Cataliotti A, Burnett JC Jr. Ventricular cardiotrophin-1 activation precedes BNP in experimental heart failure. *Peptides* 2003; 24: 889-892.
77. Ju H, Zhao S, Tappia PS, Panagia V, Dixon IMC. Effects of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1997; 35, 223–232.
78. Ju H, Zhao S, Tappia PS, Panagia V, Dixon IMC. Expression of Gq $\alpha$  and PLC- $\beta$  in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction. *Circulation* 1998; 97: 892–899.
79. Kallergis EM, Mavrakis HE, Vardas PE. Anaemia and heart failure: is its correction a therapeutic target? The role of erythropoietin. *Hellenic J Cardiol* 2005; 46: 222-225.
80. Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res* 1997; 81: 187-195.
81. Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circulation research* 1997;81:187-195
82. Kapadia SR, Yakoob K, Nader S, Thomas JD, Mann DL, Griffin BP. Elevated circulating levels of serum tumor necrosis factor-alpha in patients with hemodynamically significant pressure and volume overload. *J. Am. Coll. Cardiol* 2000; 36: 208-212.
83. Kaski JC. Local cytokine production and acute coronary events. *Int J Cardiol* 2000;73:79 – 81.
84. Katz SD, Rao R, Berman JW, Schwarz M, Demopoulos L, Bijou R. Pathophysiological correlates of increased serum tumor necrosis factor in patients with congestive heart failure. Relation to nitric oxide-dependent vasodilation in the forearm circulation. *Circulation* 1994; 90: 12-16.
85. Kawano S, Kubota T, Monden Y, Tsutsumi T, Inoue T, Kawamura N, Tsutsui H, Sunagawa K. Blockade of NF-kappaB improves cardiac

- function and survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H1337-1344.
86. Kell R, Haunstetter A, Dengler TJ, Zugck C, Kubler W, Haass M. Do cytokines enable risk stratification to be improved in NYHA functional class III patients? Comparison with other potential predictors of prognosis. *Eur Heart J* 2002; 23:70–78.
  87. Keystone EC, Ware CF. Tumor necrosis factor and anti-tumor necrosis factor therapies. *J Rheumatol Suppl* 2010;85:27-39
  88. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-b1 in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 2006; 118: 10–24
  89. Kiczak L, Paslawska U, Bania J, Ugorski M, Sambor I, Kochman A, Blach J, Chelmonska-Soyta A. Increased expression of interleukin-1 $\beta$  and its novel splice variant in canine hearts with volume overload. *Cytokine* 2008; 44: 352-360.
  90. Kittleson M, Kienle R. Myxomatous Atrioventricular Valvular Degeneration. In: Kittleson M. Kienle R. *Small Animal Cardiovascular Medicine.* Mosby, 1998.
  91. Kogure K. Pathology of chronic mitral valvular disease in the dog. *Nippon Juigaku Zasshi* 1980; 42:323-335.
  92. Kosmala W, Derzhko R, Przewlocka-Kosmala M, Orda A, Mazurek W. Plasma levels of TNF-alpha, IL-6, and IL-10 and their relationship with left ventricular diastolic function in patients with stable angina pectoris and preserved left ventricular systolic performance. *Coron Artery Dis.* 2008; 19: 375-382.
  93. Koyanagi M, Egashira K, Kubo-Inoue M, Usui M, Kitamoto S, Tomita H. Role of transforming growth factor- $\beta$ 1 in cardiovascular inflammatory changes induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Hypertension* 2000; 35: 86–90.
  94. Kukielka GI, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins KH, Michael LH, Rot A, Entman MI



- Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 95:89-103
95. Kupfah C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta 1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 463–475.
96. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K. Transforming growth factor- $\beta$  function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 2002; 106: 130–135.
97. Kvarn C, Haggstrom J, Pedersen HD, et al: Efficacy of enalapril for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic mitral regurgitation, *J Vet Intern Med* 2002; 16(1): 80-88.
98. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N engl J Med* 1990; 323: 236-241.
99. Lim H, Zhu YZ. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cell –Mol Life Sci* 2006; 63: 2584-2596.
100. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2006;83(suppl):456S– 60S.
101. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135– 43.
102. Loppnow H, Werdan K, Werner C. The enhanced plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors (sTNF-R1; sTNF-R2) and interleukin-10 (IL-10) in patients suffering from chronic heart failure are reversed in patients treated with beta-adrenoceptor antagonist. *Auton Autacoid Pharmacol* 2002; 22:83–92.

103. MacGowan GA, Mann DL, Kormos RL, Feldman AM, Murali S. Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am J Cardiol* 1997; 79:1128–1131.
104. Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Kinoshita M. High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1587–1593.
105. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart : Past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 2002; 91:988-998.
106. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994; 72: 561-566.
107. Matsumura T, Tsushima K, Ohtaki E. Effects of carvedilol on plasma levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in nine patients with dilated cardiomyopathy. *J Cardiol* 2002; 39:253–257.
108. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 2012;122(4):143-59
109. Mohler ER III, Sorensen LC, Ghali JK, Schocken DD, Willis PW, Bowers JA, Cropp AB, Pressler ML. Role of cytokines in the mechanism of action of amlodipine: the PRAISE Heart Failure Trial. Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:35–41.
110. Mow T, Pedersen HD. Increased endothelin receptor density in myxomatous canine mitral valve leaflets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 254-260.
111. Munger MA, Johnson B, Amber IJ, Callahan KS, Gilbert EM. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996; 77:723–727.

112. Nathan C, Sporn M. Cytokine in context. *J Cell Biol* 1991; 113: 981-986.
113. Neissner A, Hosensinner PJ, Rychli K, Neuhold S, Zorn G, Richter B, Hülsmann M, Berger R, Mörtl D, Huber K, Wojta J, Pacher R. Prognostic value of apoptosis markers in advanced heart failure patients. *Eur Heart J* 2009; 30: 789-796.
114. Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H. Effects of transforming growth factor- $\beta$ 3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. *AJVR* 2011; 72 (2): 194-202.
115. Ohtsuka T, Hamada M, Hiasa G, Sasaki O, Suzuki M, Hara Y, Shigematsu Y, Hiwada K. Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:412–417.
116. Oikonomou E, Tousoulis D, Siasos G, Zaromitidou M, Papavassiliou AG, Stefanadis C. The Role of Inflammation in Heart Failure: New Therapeutic Approaches. *Hellenic J Cardiol* 2011; 52: 30-40.
117. Okonko DO, Anker SD. Anemia in chronic heart failure: pathogenetic mechanisms. *J Card Fail* 2004; 10: S5-9.
118. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985; 230: 630-632.
119. Olsen L, Haggstrom J, Petersen H. Acquired Valvular Heart Disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of veterinary internal medicine - Diseases of the dog and cat. Seventh ed.* St. Louis - Missouri: Saunders Elsevier, 2010.
120. Olsen LH, Mortensen K, Martinussen T, Larsson LI, Baandrup U, Pedersen HD. Increased NADPH-diaphorase activity in canine myxomatous mitral valve leaflets. *J Comp Pathol* 2003;129(2-3):120-30.
121. Oral H, Sivasubramanian N, Dyke DB, Mehta RH, Grossman M, Briesmiester K, Fay WP, Pagani FD, Bolling SF, Mann DL, Starling MR. Myocardial proinflammatory cytokine expression and left ventricular remodeling in patients with chronic mitral regurgitation. *Circulation* 2003;107:831-837

- 122.Oyama MA and Chittur SV. Genomic expression patterns of mitral valve tissues from dogs with degenerative mitral valve disease. *J Vet Res* 2006; 67: 1307-1331.
- 123.Oyama MA and Levy RJ. Insights into serotonin signaling mechanisms associated with degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 27-36.
- 124.Parissis JT, Filippatos G, Nikolaou V, Adamopoulos S. Cytokines and anti-cytokine therapeutic approaches to chronic heart failure. *Eur J Intern Med* 2002; 13:356-364.
- 125.Paslawska U, Kiczak L, Ugorski M, Chelmońska-Soyta A. Increased Expression of Pro-Inflammatory Cytokines mRNA in Myocardium of Dogs with Mitral Insufficiency. Proceedings of the 16th ECVIM-CA Congress, 2006. Amsterdam. Netherlands.
- 126.Pedersen HD, Häggström J. Mitral valve prolapse in the dog: a model of mitral valve prolapse in man. *Cardiovascular Research* 2000;47:234-243
- 127.Pedersen HD, Kristensen BO, Norby B, Lorentzen KA. Echocardiographic study of mitral valve prolapse in Dachshunds. *J Vet Med A* 1996;43:103-110.
- 128.Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced AT1 receptor up-regulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ Res* 2002; 91: 1119–1126.
- 129.Pfeffer JM, Fischer TA, Pfeffer MA. Angiotensin-converting enzyme inhibition and ventricular remodeling after myocardial infarction. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:805–826.
- 130.Pohlert D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF- $\beta$  and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2009; 1792 (8): 746-756.
- 131.Pouchelon JL, Jamet N, Gouni V, Tissier R, Serres F, Carlos Sampedrano C, Castaignet M, Lefebvre HP, Chetboul V. Effects of benazepril on

- survival and cardiac events in dogs with asymptomatic mitral valve disease: a retrospective study of 141 cases. *J Am Vet Intern Med.* 2008; 22(4):905-914.
132. Prabhu SD, Chandrasekar B, Murray DR, Freeman GL. Beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling. *Circulation* 2000; 101:2103–2109.
133. Prosek R, Ettinger S. Biomarkers of Cardiovascular Disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of veterinary internal medicine - Diseases of the dog and cat.* Seventh ed. St. Louis - Missouri: Saunders Elsevier, 2010.
134. Qing M, Schumacher K, Heise R, Woltje M, Vazquez-Jimenez JF, Richter T, Arranda-Carrero M, Hess J, vonBernuth G, Seghaye MC. Intramyocardial synthesis of pro- and anti-inflammatory cytokines in infants with congenital cardiac defects. *Journal of the American College of Cardiology* 2003;41:2266-2274
135. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* 2008, R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0, [www.R-project.org](http://www.R-project.org)
136. R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing.* 2011 R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
137. Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Scheon FJ. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodelling in myxomatous heart valves. *Circulation* 2001; 104: 2522-2532.
138. Rajamannan NM, Caplice N, Anthikab F, Sebo TJ, Orszulak TA, Edwards WD, Tajik J, Schwartz RS. Cell proliferation in carcinoid valve disease: a mechanism for serotonin effects. *J Heart Valve Dis* 2001; 10:827-831.
139. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk HD, Coats AJS, Anker SD. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000; 102:3060–3067.

140. Recchia FA, Bernstein RD, Sehgal PB, Ferreri NR, Hintze TH. Cytokines are not a requisite part of the pathophysiology leading to cardiac decompensation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 2000;223:47-52.
141. Rizvi MA, Katwa L, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28(2):243-52.
142. Roig E, Orus J, Pare C, Azqueta CM, Filella X, Perez-Villa F, Heras M, G Sanz. Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1998; 82:688-90.
143. Saraste A, Voipio-Pulkki LM, Heikkila P, Laine P, Nieminen MS, Pulkki K. Soluble tumor necrosis factor receptor levels identify a subgroup of heart failure patients with increased cardiomyocyte apoptosis. *Clin Chim Acta* 2002; 320:65-67.
144. Satoh M, Iwasaka J, Nakamura M, Akatsu T, Shimoda Y, Hiramori K. Increased expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme and tumor necrosis factor- $\alpha$  in peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 6(7):869-75.
145. Schultz JE, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. TGF- $\beta$ 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest* 2002; 109:787-796.
146. Seta Y, Kanda T, Tanaka T, Arai M, Sekiguchi K, Yokoyama T, et al. Interleukin-18 in patients with congestive heart failure: induction of atrial natriuretic peptide gene expression. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2000; 108:87-95.
147. Seta Y, San K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Card Fail* 1996; 2: 243-249.
148. Shah SJ, Marcus GM, Gerber IL, Mckeown BH, Vessey JC, Jordan MV, Huddleston M, Foster E, Chatterjee K, Michaels AD. High-sensitivity C-

- reactive protein and parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail.* 2006; 12: 61-65.
149. Sharma R, Anker SD. Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. *Int J Cardiol* 2002; 85: 161-171.
150. Sharma R, Coats AJS, Anker SD. The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. *Int J Cardiol* 2000;72:175 – 86.
151. Sisson D. Pathophysiology of heart failure. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of veterinary internal medicine - Diseases of the dog and cat.* Seventh ed. St. Louis - Missouri: Saunders Elsevier, 2010.
152. Solís-Herruzo JA, Solís-Muñoz P, Muñoz-Yagüe T, García-Ruiz I. Molecular targets in the design of antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2011; 103(6):310-23
153. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000;102:1944-1949
154. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520-530
155. Stenvinkel P, Andersson P, Wang T. Do ACE-inhibitors suppress tumor necrosis factor-alpha production in advanced chronic renal failure? *J Intern Med* 1999;246:503-507
156. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 2000; 46, 250–256.
157. Sun Y, Cleutjen JPM, Diaz-Arias AA, Weber KT. Cardiac angiotensin-converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1423–1432.
158. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Ramirez FJ. Angiotensin II, transforming growth factor-beta1 and repair in the infarcted heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 8: 1559–1569.

159. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction. Pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000; 101: 2981–2988.
160. Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ, Maki TM, Marsh JD, Colucci W. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1470–1476.
161. Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, LeJemtel TH. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:964–971
162. Terzo E, Di Marcello M, McAllister H, Glazier B, Lo Coco D, Locatelli C, Palermo V, Brambilla PG. Echocardiographic assessment of 537 dogs with mitral valve prolapse and leaflet involvement. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009;50:416-422.
163. The IMPROVE Study Group. Acute and short-term hemodynamic, echocardiographic, and clinical effects of enalapril maleate in dogs with naturally acquired heart failure: results of the invasive multicenter prospective veterinary evaluation of enalapril study (IMPROVE study). *J Vet Intern Med* 1995; 19(4): 234-242
164. The SOLVD investigators. Effects of enalapril on mortality and development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Engl J Med* 1992;327 (10):685-691.
165. Thomas WP, Gaber CE, Jacobs GJ, Kaplan PM, Lombard CW, Moise NS, Moses BL. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Inter Med* 1993;4:247-252
166. Thompson NL. Transforming growth factor-beta1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth factors* 1988; 1: 91–99.
167. Torre Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular



- ejection fraction: a report from the SOLVD study. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:1201–6.
168. Torre- Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996; 93: 704-711.
169. Torre- Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumour necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* 1995; 92: 1487-1493.
170. Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C. Inflammation and endothelial dysfunction as therapeutic targets in patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 2005; 100: 347-353.
171. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, Mabuchi N, Sawaki M, Kinoshita M . Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:391–398.
172. Tsutamoto T, Wada A, Matsumoto T, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Yamamoto T, Horie H, Sugimoto Y, Kinoshita M. Relationship between tumor necrosis factor- $\alpha$  production and oxidative stress in the failing hearts of patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:2086–2092.
173. Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, Merli E, Soukhomovskaia O, Francolini G, Cicchitelli G, Olivares A, Parrinello G, Percoco G, Guardigli G, Mele D, Pirani R, Ferrari R. Tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the Cytokine-Activation and Long-Term Prognosis in Myocardial Infarction (C-ALPHA) study. *Circulation* 2005; 111: 863-870.
174. Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ, Sawyer DE, Levy D, Wilson PWF, D'Agostino RB. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior

- myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003; 107:1486–1491.
175. Villareal FJ, Dillmann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 1992; 262: 1861–1866.
176. Vistnes M, Wæhre A, Nygård S, Sjaastad I, Andersson KB, Husberg C, Christense G. Circulating cytokine levels in mice with heart failure are etiology dependent. *Journal of Applied Physiology* 2010;108:1357-1364-
177. Vredevoe DL, Widawski M, Fonarow GC, Hamilton M, Martínez-Maza O, Gage JR. Interleukin-6 (IL-6) expression and natural killer (NK) cell dysfunction and anergy in heart failure. *Am J Cardiol* 2004;93(8):1007-11
178. Ware WA. Patologie valvolari acquisite In: *Malattie dell'apparato cardiovascolare – Cane e Gatto: UTET Scienze Medice Torino*. 2007
179. Weber KT: Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 1997; 96: 4065–4082.
180. Weber H, Webb ML, Serafino R, Taylor DS, Moreland S, Norman J, Molloy CJ. Endothelin-1 and angiotensin-II stimulate delayed mitogenesis in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for common signaling mechanisms. *Mol Endocrinol*. 1994 Feb;8(2):148-58.
181. Wei GC, Sirois MG, Qu R, Liu P, Rouleau JL. Subacute and chronic effects of quinapril on cardiac cytokine expression, remodeling, and function after myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39: 842–850.
182. Whitney JC. Cardiovascular pathology. *J Small Anim Pract* 1967; 8: 459-465.
183. Wiedermann CJ, Beimbold H, Herold M, Knapp E, Braunsteiner H. Increased levels of serum neopterin and decreased production of neutrophil superoxide anions in chronic heart failure with elevated levels of tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:1897–1901.
184. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Inomata T, Machida Y, Oshada K, Izumi T. Circulating levels of interleukin 18 reflects etiologies of heart failure:

Th1/Th2 cytokine imbalance exaggerates the pathophysiology of advanced heart failure. *Journal of Cardiac Failure* 2002; 8:21-27

185. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007; 13(8):952-61

186. Zois NE, Moesgaard SG, Kjelgaard-Hansen M, Rasmussen CE, Falk T, Fossing C, Häggström J, Pedersen HD, Olsen LH. Circulating cytokine concentrations in dogs with different degrees of myxomatous mitral valve disease. *The Veterinary Journal* 2011, doi:10.1016/j.tvjl.2011.05.009