



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ENFERMEDAD DEGENERATIVA DE LA VÁLVULA MITRAL EN
CANINOS, ENFOQUE MULTIPARAMÉTRICO.

Dra. Natalie Alexandra Ruiz Algibay
TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2020



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ENFERMEDAD DEGENERATIVA DE LA VÁLVULA MITRAL EN
CANINOS, ENFOQUE MULTIPARAMÉTRICO.

Dra. Natalie Alexandra Ruiz Algibay

Dr. Alejandro Benech

Director de Tesis

Dra. Paula Pessina

Co-directora

2020

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL
DE DEFENSA DE TESIS

Presidente: Luis Delucchi DMTV, MSc.

Profesor Agregado de la Unidad de clínica de pequeños animales, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

Segundo Miembro: Daniela Izquierdo DCV, MSc, PhD.

Profesora Agregada de la Unidad de cirugía de pequeños animales, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

Tercer miembro: Javier Del Ángel Caraza MVZ, EspMCPyG, PhD

Profesor del Hospital veterinario para pequeñas especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UAEM.



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Sala Virtual de Plataforma Webex, Facultad de Veterinaria, UdelaR, lunes 15 de marzo de 2021

Tribunal: Dr. Luis Delucchi, Dra. Daniela Izquierdo, Dr. Javier Del Ángel Caraza

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4469136-6	Ruiz Algibay, Natalie Alexandra	SSS	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Luis Delucchi

Dra. Daniela Izquierdo

Dr. Javier Del Ángel Caraza

FIRMA

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:
B.B.B. – 6 , o S.S.S. – 12

AGRADECIMIENTOS

“No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje, perseguir tus sueños, destrabar el tiempo, correr los escombros y destapar el cielo”

Mario Benedetti

Fue un camino difícil de transitar, pero me crucé con las personas que me hicieron posible llegar al final, y por eso no puedo dejar de reconocerlas.

Quiero agradecer a mi familia, mi esposo Diego y mi hija Sofi, por todo el tiempo que no pude dedicarles y que, sin embargo, siempre supieron comprender y continuaron apoyándome.

A mi Director de tesis Alejandro Benech por creer en mí y darme su apoyo incondicional desde el primer día.

A mi Co-directora de tesis Paula Pessina y a Ana Meikle por su ayuda invaluable para cumplir con esta difícil tarea.

A mis compañeros de cátedra Luis Delucchi, Mary Cuns y Claudia Della Cella por permitirme culminar con este proceso.

A mis amigas y compañeras de oficina Alicia Decuadro (quien me integró desde que llegué a la cátedra y me ayudó a tener confianza en mi misma), Natalia Bartesaghi, Cecilia Menéndez y Carolina Herrera por el apoyo y el buen humor aún en tiempos de mucho estrés.

A los compañeros de Imagenología (Guillermo, Victoria, David, Sergio, Flavia y Paola) y del Laboratorio de Análisis Clínicos (Patricia, Cinthya, Adrián, Eugenia, Dinora, Gonzalo y Marcela) por permitirme desarrollar los estudios que dan vida a esta tesis, y por la buena disposición siempre.

A Claudia del Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal por su ayuda para procesar los kits.

Al personal de enfermería (Mariana, Sofía, Silvana y Silvina) por la colaboración para obtener las muestras.

A mi amiga, la mejor teacher, Andrea Fernández.

A Mónica Fernández por compartir sus pacientes.

A todos los que de alguna manera me ayudaron a cumplir con este sueño.

INDICE

1. RESUMEN	vii
2. SUMMARY	viii
3. INTRODUCCIÓN.....	1
4. ANTECEDENTES	2
4.1 Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca	2
4.1.1) Respuesta del miocardio ante la insuficiencia cardíaca	2
4.1.2) Respuesta del sistema nervioso simpático	4
4.1.3) Activación del sistema renina angiotensina aldosterona	7
4.2 Enfermedad degenerativa de la válvula mitral.....	9
4.II.1) Introducción.....	9
4.II.2) Epidemiología.....	9
4.II.3) Etiología	9
4.II.4) Estructura valvular normal y cambios patológicos.....	11
4.II.4.1) Aparato valvular normal	11
4.II.4.2) Hallazgos patológicos	12
4.II.5) Fisiopatología	14
4.II.6) Diagnóstico y estadificación	15
4.II.6.1) Clínico	15
4.II.6.2) Ecocardiografía	18
4.II.6.3) Electrocardiografía	20
4.II.6.4) Radiología	22
4.II.6.5) Presión arterial	24
4.II.6.6) Hemograma.....	24
4.II.6.7) Biomarcadores cardíacos.....	26
4.II.6.8) Biomarcadores de inflamación sistémica	28
Proteína C reactiva.....	28
4.II.6.9) Biomarcadores renales	29
4.II.6.10) Hemostasia	29
4.II.7) Tratamiento	30
4.II.8) Pronóstico	31
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
6. HIPÓTESIS	35
7. OBJETIVOS	36
8. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACION	37

9. MATERIALES Y MÉTODOS	38
9.I) Animales	38
9.II) Evaluación clínica cardiológica.....	39
9.III) Radiología	39
9.IV) Ecocardiografía.....	40
9.V) Electrocardiograma	41
9.VI) Medición de presión arterial	42
9.VII) Toma de muestras de sangre	42
9.VIII) Estudios hematológicos	42
9.VIII) Bioquímica	42
9.IX) Biomarcadores.....	43
9.X) Orina	44
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
11. RESULTADOS	46
11.I) Parámetros clínicos.....	46
11.II) Radiografía, ecocardiografía y electrocardiograma	47
11.III) Variables bioquímicas	49
11.IV) Hemograma	51
11.V) Hemostasia	52
11.VI) Orina	52
11.VII) Proteína C reactiva	53
12. DISCUSIÓN	54
13. CONCLUSIONES.....	64
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

INDICE DE TABLAS

1. Efectos adversos cardiovasculares y renales de la aldosterona y la angiotensina II.....	8
2. Clasificación de la insuficiencia cardíaca según American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) (Keene et al., 2019) y de la International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC, 1994).....	17
3. Potencias a las cuales se elevó el peso vivo de cada animal para normalizar los valores ecocardiográficos obtenidos.....	41
4. Características de los animales y parámetros clínicos (Promedio± Error Estándar).....	47
5. Medidas e índices (Promedio± Error Estándar) de las variables de radiografía, ecocardiograma y electrocardiograma.....	48
6. Concentraciones (Promedio± Error Estándar) de las variables bioquímicas estudiadas.....	50
7. Recuento celular, índices y concentraciones (Promedio± Error Estándar) de los parámetros del hemograma.....	51
8. Tiempo, concentración y recuento (Promedio± Error Estándar) de las variables de coagulación estudiadas.....	52
9. Valores (Promedio± Error Estándar) de los parámetros evaluados en la orina.....	53
10. Valores (Promedio± Error Estándar) de la proteína C reactiva.....	53

INDICE DE FIGURAS

1. Esquema de la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca.....	3
2. Vista dorsolateral de un aparato valvular normal canino.....	11
3. Fotografía de corte histológico del tercio proximal de la valva posterior de un canino sano.....	12
4. Aparato valvular de un canino afectado con enfermedad degenerativa de la válvula mitral.....	13
5. Fotografía de corte histológico de valva mitral de un canino afectado con enfermedad degenerativa de la válvula mitral en un estadio grave.....	14
6. Imágenes ecocardiográficas en modo B obtenidas en un corte paraesternal derecho, ubicados en la base del corazón.....	19
7. Imágenes ecocardiográficas en modo M obtenidas en un corte paraesternal derecho del ventrículo izquierdo a nivel de los músculos papilares.....	20
8. Registro electrocardiográfico obtenido en derivada II de un canino con EDVM en estadio C.....	21
9. Vista lateral de radiografía de tórax de un canino con enfermedad degenerativa de la válvula mitral. Se realizó la escala VHS (vertebral heart score) con un resultado de 11 cuerpos vertebrales, lo cual se considera agrandamiento cardíaco.....	23
10. Vista lateral de radiografía de tórax de un canino con enfermedad degenerativa de la válvula mitral. Se realiza la escala VLAS (vertebral left atrium score) con un resultado de 2,1 cuerpos vertebrales. En este caso puede considerarse que no hay agrandamiento atrial.....	23
11. Imagen del procedimiento de medida de presión arterial con el dispositivo oscilométrico PetMap®.....	24
12. Imágenes de la realización del ELISA para la determinación de la proteína C reactiva.....	43

ABREVIATURAS

ACVIM: American College of Veterinary Internal Medicine

AI: Atrio izquierdo

AI/Ao: Ratio atrio izquierdo /aorta

Ao: Aorta

ANP: Péptido natriurético atrial

APTT: Tiempo de tromboplastina parcial activado

BNP: Péptido natriurético cerebral

CKCS: Cavalier King Charles spaniel

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

EDVM: Enfermedad degenerativa de la válvula mitral

FAS: Fosfatasa alcalina sérica.

FC: Frecuencia cardíaca

FS: Fracción de acortamiento

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

GOT: Aspartato aminotransferasa

GPT: Alanina amitrotransferasa

ISACHC: International Small Animal Cardiac Health Council

IVSD: Septum interventricular en diástole

IVSS: Septum interventricular en sístole

LA: Atrio izquierdo

LA/Ao: ratio atrio izquierdo/aorta

LVIDD: Diámetro del ventrículo izquierdo al final de la diástole

LVIDS: Diámetro del ventrículo izquierdo al final de la sístole

LVPWD: Pared libre del ventrículo izquierdo en diástole

LVPWS: Pared libre del ventrículo izquierdo en sístole

PD: Presión arterial diastólica

PM: Presión arterial media

PS: Presión arterial sistólica

PT: Proteínas totales

TP: Tiempo de protrombina

VLAS: Vertebral left atrium score

VHS: Escala cardio vertebral/ Vertebral heart score

1. RESUMEN

La enfermedad degenerativa de la válvula mitral es la patología cardíaca más prevalente en los caninos. Se caracteriza por poseer una evolución relativamente benigna que puede llevar años de evolución sin presentar signos clínicos. Así mismo muchos caninos nunca desarrollan la fase clínica de la enfermedad a lo largo de su vida. Por este motivo se vuelve imprescindible obtener información adicional para conocer el estado general del animal y de esta manera lograr formular un pronóstico certero. En este trabajo se incluyeron tres grupos de perros de ambos sexos. El grupo control fue integrado por 14 perros con un promedio de edad de 8,6 años, sin patologías cardíacas ni de otra índole. El segundo grupo estuvo conformado por caninos con enfermedad degenerativa de la válvula mitral en estadio B, con un número 10 de perros de 11,6 años en promedio. El tercer grupo lo formaron 14 caninos con enfermedad degenerativa de la válvula mitral en estadio C, con un promedio de edad de 12,6 años. Cabe destacar que no se contemplaron animales que presentaban otras patologías al momento de la selección. A los tres grupos se les realizó una evaluación clínica, la cual destacó el aumento de la frecuencia cardíaca y del grado de soplo a medida que la enfermedad estaba más avanzada. También se les efectuó un registro electrocardiográfico, la determinación de la Vertebral Heart Score y la Vertebral Left Atrium Score en la radiografía de tórax y una ecocardiografía. Estos exámenes arrojaron resultados significativos que reflejaron la remodelación de las cámaras cardíacas, haciéndose más notorios en los animales del estadio C. Los estudios de laboratorio que incluyeron múltiples parámetros destacan la pérdida de función renal, con aumento de urea y creatinina (en estadio C) y disminución de la densidad urinaria (en ambos estadios). El hemograma no demostró alteraciones significativas, salvo un incremento de las plaquetas pero dentro de los valores normales para los caninos en estadio C. Los parámetros de funcionalidad hepática se mantuvieron sin cambios. Las pruebas de crisis sanguínea también, sin embargo el fibrinógeno fue mayor a medida que se agravó el cuadro clínico. La proteína C reactiva también aumentó en los perros enfermos, permitiendo discriminar los tres grupos, siendo mayor en el estadio C. Sin embargo, el incremento no fue exponencial como se aprecia en casos de infección o inflamación sistémica. Con estos datos podemos reconocer la necesidad de realizar estudios colaterales que nos permitan determinar las comorbilidades presentes en nuestros pacientes para elaborar el plan terapéutico más adecuado y un pronóstico más acertado.

2. SUMMARY

Degenerative mitral valve disease is the most prevalent heart disease in canines. It is characterized by having a relatively benign evolution that can take years of evolution without presenting clinical signs. Likewise, many canines never develop the clinical phase of the disease throughout their lives. For this reason, it is essential to obtain additional information to assess the general state of the animal and so to formulate an accurate prognosis. Three groups of dogs of both sexes were included in this work. The control group consisted of 14 dogs with an average age of 8.6 years, without cardiac or other pathologies. The second group consisted of canines with stage B degenerative mitral valve disease, with a number of 10 dogs of 11.6 years of average age. The third group consisted of 14 canines with stage C degenerative mitral valve disease, with an average age of 12.6 years. It should be noted that animals suffering from other pathologies were not considered at the time of selection. The three groups underwent clinical evaluation, which highlighted the increase in heart rate and the degree of murmur as the disease progressed. An electrocardiographic recording, the determination of the Vertebral Heart Score and Vertebral Left Atrium Score in the chest X-ray and an echocardiography were also performed. These examinations showed significant results that reflected the remodeling of the cardiac chambers, becoming more noticeable along with the progression of the disease. Laboratory studies that included multiple parameters highlight the loss of renal function, with an increase in urea (in stage C), creatinine (in stage C) and a decrease in urinary density (in both stages). The hemogram did not show significant alterations, except for an increase in platelets but within normal values for stage C canines. The liver function parameters remained unchanged. Blood crass tests also, however, fibrinogen was higher as the clinical picture worsened. C-reactive protein also increased in sick dogs, allowing the three groups to be discriminated, being higher in stage C. However, the increase was not exponential as seen in cases of infection or systemic inflammation. With these data, we can recognize the need for collateral studies that allow us to determine the comorbidities present in our patients in order to develop the most appropriate therapeutic plan and a more accurate prognosis.

3. INTRODUCCIÓN

Los animales de compañía se han convertido en un miembro más de la familia, y entre estos, el canino es el preferido por excelencia. Este valor afectivo que se les ha otorgado hace que los perros sean más longevos, con la consecuente aparición de enfermedades crónicas. Además, la tendencia actual es a favor de adquirir animales de pequeño porte, ya que se adaptan mejor al estilo de vida de las personas. Ambas condiciones son factores predisponentes de enfermedades cardíacas, sobretodo de la enfermedad degenerativa de la válvula mitral (EDVM) (Fox, 2012). Se estima que uno de cada diez caninos que ingresan a consulta a una clínica veterinaria presenta patologías cardíacas, y la EDVM es la más prevalente, correspondiendo aproximadamente al 75% de los diagnósticos (Atkins et al., 2009; Borgarelli y Haggstrom, 2010). En nuestro país, la incidencia de ésta enfermedad se acerca al 71% (Berro y Wijma, 2017), compartiendo la tendencia mundial. A pesar de su importancia, su etiología continúa siendo desconocida (Gordon et al., 2017), y por lo tanto la posibilidad de realizar un tratamiento curativo es muy escasa, ya que el acceso a una intervención quirúrgica reparadora es prácticamente nulo. Por este motivo es fundamental abordar al paciente desde múltiples ángulos para entender por completo su estado de situación y de esta forma, administrar el tratamiento que mejor se adecue al paciente. Esto se fundamenta en que si bien esta enfermedad compromete primariamente al corazón, desencadena múltiples repercusiones sistémicas a las cuales sólo se puede acceder si se realizan los estudios complementarios (Nicolle et al., 2007; Tarnow et al., 2007; Pouchelon et al., 2015; Yu y Huang, 2016; Petric et al., 2018). Estas fallas determinan que el tratamiento no sea exitoso, o peor aún, que desarrolle alteraciones en otros sistemas como consecuencia del mismo. Además, se trata de una enfermedad crónica y de curso relativamente benigno, cuya fase asintomática puede acompañar al animal por años. Sin embargo este grupo puede ser muy heterogéneo, con caninos que presentan un deterioro valvular moderado y otros que están al borde de desarrollar falla cardíaca (Borgarelli et al., 2012). Así mismo, una vez que se alcanza la fase clínica, el pronóstico puede ser muy variable (Haggstrom et al., 2007; Borgarelli et al., 2008; Serres et al., 2009). Entonces es esencial brindar al propietario un pronóstico certero, para no generar falsas expectativas. En ese sentido se han desarrollado nuevas formas de evaluación que otorgan al veterinario clínico herramientas para fundamentar su opinión. Las más relevantes incluyen el péptido natriurético tipo B (Chetboul et al., 2009; Serres et al., 2009; Tarnow et al., 2009; Reynolds et al., 2012), la troponina I (Ljungvall et al., 2012; Noszczyk-Nowak, 2010) y recientemente la proteína C reactiva (Polizopoulou et al., 2015).

4. ANTECEDENTES

4.1 Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca es un síndrome clínico en el que el corazón no logra satisfacer las necesidades metabólicas tisulares corporales (Robinson y Maxie, 1991). Las alteraciones hemodinámicas resultantes de la falla cardíaca se agravan porque la función contráctil y de relajación del corazón están deprimidas como consecuencia de variaciones bioquímicas y biofísicas de los miocardiocitos. Estos trastornos celulares aceleran el deterioro del miocardio y la muerte de los miocitos (Katz, 1992). Existen dos formas principales en las que se presenta la imposibilidad del corazón para cumplir con su función: insuficiencia de bajo gasto, donde es incapaz de bombear suficiente sangre hacia la aorta (Ao) o a la arteria pulmonar para mantener la presión arterial; y la insuficiencia cardíaca congestiva, donde no logra vaciar correctamente el reservorio venoso. Por lo tanto, la sintomatología clínica va a depender de cuál sea la principal falla presente en determinado paciente. En caninos con insuficiencia de bajo gasto los signos serán depresión, letargo, hipotensión, síncope; mientras que en el caso de la falla cardíaca congestiva serán edema pulmonar, ascitis, derrame pleural, edema periférico (de Morais y Schwartz, 2007). También podemos clasificar la insuficiencia cardíaca según la porción del corazón que está fallando predominantemente como: derecha, izquierda o generalizada. Ésta última aparece en etapas avanzadas de la enfermedad cardíaca, ya que como el sistema cardiovascular es un circuito cerrado, el fallo de un lado alterará el otro. De esta manera, los signos clínicos se asociarán a ascitis y edema periférico en el caso de estar afectado el lado derecho; edema pulmonar con la consecuente tos y disnea en caso de estar afectado el lado izquierdo; o una mezcla de los signos anteriormente presentados en caso de ser bilateral, que además frecuentemente se asocia con la presencia de derrame pleural. Los signos de bajo gasto cardíaco pueden aparecer en cualquiera de estas presentaciones (Robinson y Maxie, 1991).

4.1.1) *Respuesta del miocardio ante la insuficiencia cardíaca*

Esencialmente, la insuficiencia cardíaca puede aparecer por la incapacidad del corazón para contraerse e impulsar sangre correctamente (insuficiencia sistólica), para dilatarse y lograr un llenado ventricular adecuado (insuficiencia diastólica) o ambas. El resultado final común es una reducción del volumen

sistólico, que lleva a una caída del gasto cardíaco y a la reducción de la presión arterial (de Morais y Schwartz, 2007) (Figura 1)). La insuficiencia sistólica puede deberse a una reducción de la contracción (insuficiencia miocárdica), a un aumento de la presión ventricular (sobrecarga de presión) o un incremento en el volumen sanguíneo ventricular (sobrecarga de volumen). Ésta clasificación es importante ya que explica parte del remodelamiento que sufre el corazón en las diferentes entidades patológicas. Cuando hablamos de insuficiencia miocárdica en el canino podemos diferenciarla en primaria (cuya patología representativa es la cardiomiopatía dilatada) o secundaria a una sobrecarga crónica de volumen o de presión. La sobrecarga de presión se refiere a que la salida de sangre está parcialmente impedida, por lo que los ventrículos deben realizar un esfuerzo mayor para lograr la eyección.

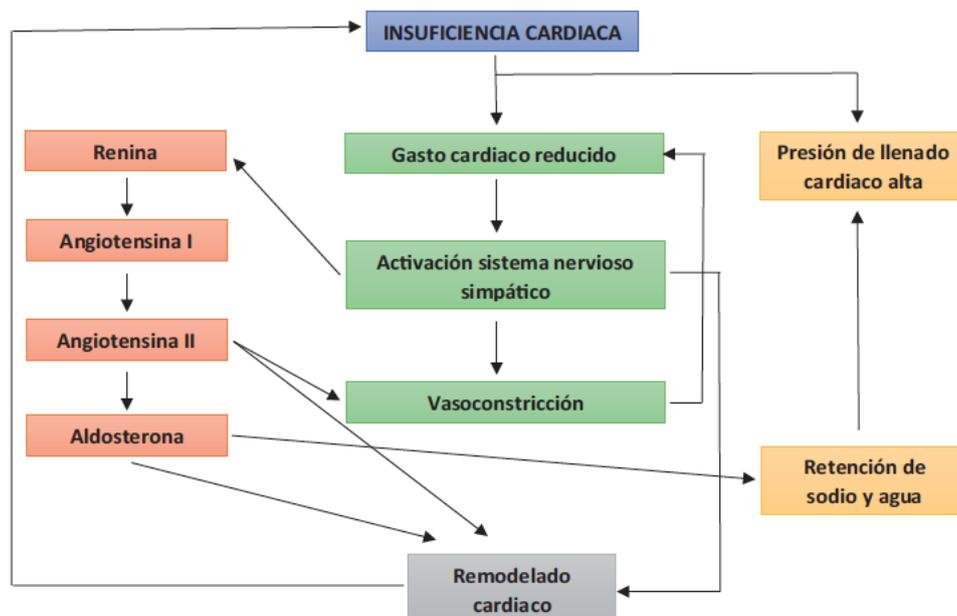


Figura 1: Esquema del desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Tomado de https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.blog.formacionalcala.es%2F2016%2F11%2F11%2Finsuficiencia-cardiaca%2F&psig=AOvVaw0gNZQNXIhiaCg-CM-BCbTg&ust=1606937036633000&source=images&cd=vfe&ved=2ahUKEwj52Lwa3tAhWFM7kGHb-sC_AQjRx6BAgAEAc.

En el canino, generalmente es debida a una estenosis subaórtica o a hipertensión sistémica (del lado izquierdo), o a una estenosis pulmonar (del lado derecho). La sobrecarga de volumen puede aparecer en casos de

insuficiencia valvular (EDVM como principal exponente), comunicaciones anómalas (por ejemplo conducto arterioso persistente) o en estados de alto gasto cardíaco (como sucede en el hipertiroidismo). En este proceso el ventrículo debe lograr acomodar el exceso de sangre que está recibiendo (de Morais y Schwartz, 2007). La respuesta final del miocardio ante la sobrecarga de presión ó de volumen es la hipertrofia. La hipertrofia cardíaca se logra a través de un aumento en la masa de las células miocárdicas, pero no de su número, ya que la capacidad del miocito para dividirse disminuye rápidamente antes del nacimiento. Existen dos variedades de hipertrofia: concéntrica y excéntrica. La hipertrofia concéntrica se caracteriza por un engrosamiento marcado de la pared ventricular y de los músculos papilares, con disminución de la luz ventricular. Este tipo de hipertrofia es la que deriva de una sobrecarga de presión. La hipertrofia excéntrica está determinada por un incremento en el radio ventricular y un moderado aumento en el espesor parietal. Este tipo de hipertrofia se desarrolla como consecuencia de una sobrecarga de volumen (Robinson y Maxie, 1991). La disfunción diastólica aparece por un defecto en el llenado ventricular. Se considera insuficiencia cardíaca diastólica cuando los signos clínicos resultantes se presentan con una función sistólica ventricular normal o casi normal (Lenihan et al, 1995). Las alteraciones que determinan la aparición de la insuficiencia diastólica pueden ser clasificadas como una relajación anómala al inicio de la diástole, una capacidad alterada que involucra toda la diástole, o una constricción externa impuesta por el pericardio (Dukes McEwan, 2000). Existe otro tipo de insuficiencia cardíaca que está originado en perturbaciones graves del ritmo. Las bradiarritmias graves y las taquicardias pueden comprometer el gasto cardíaco (Dukes McEwan, 2000).

4.1.2) *Respuesta del sistema nervioso simpático*

Sea cual sea la causa de la insuficiencia cardíaca, existe un descenso del gasto cardíaco y de la presión arterial. El mantenimiento de la presión arterial es parte de un sistema de control complejo integrado por los sistemas cardiovascular, nervioso, renal y endócrino. La caída de la presión arterial es detectada por los barorreceptores ubicados en el cayado aórtico y en el seno carotideo. La respuesta inmediata ante esta situación es la disminución de los estímulos parasimpáticos y un aumento concomitante de los simpáticos que se traduce en vasoconstricción periférica y taquicardia (de Morais y Schwartz, 2007). Como consecuencia de estos mecanismos se reduce la perfusión tisular, que va a afectar varios órganos como la piel, intestino, músculo esquelético y riñones. La caída en el aporte de oxígeno provoca un cambio hacia un metabolismo anaerobio, que conduce a un aumento del ácido láctico. La hipoxia, acidosis e hipercapnia son censados por los quimiorreceptores

centrales y periféricos, los cuales estimulan aún más al sistema simpático (Oyama, 2009). Luego de ser estimulado el sistema nervioso simpático se incrementa la actividad de las catecolaminas a dos niveles: en las terminales nerviosas simpáticas aumenta la liberación de norepinefrina y la disminución de su recaptación; y a nivel de las glándulas adrenales amplía la liberación de epinefrina (Oyama, 2009). El receptor primario de la norepinefrina en el corazón sano es el β_1 , sin embargo, el aumento en la concentración de norepinefrina provoca una regulación negativa en la expresión de estos receptores. En corazones sanos el cociente entre receptores $\beta_1:\beta_2$ es de 80:20, mientras que en corazones insuficientes es de 60:40 (Carson, 2001). Luego de la unión al receptor, se produce una cascada de segundos mensajeros que culmina con el incremento intracelular de calcio en el cardiomiocito que se traduce en un incremento en la fuerza de contracción y de la frecuencia cardíaca. En el músculo liso periférico el receptor primario adrenérgico es el α_1 , que luego de ser activado por la norepinefrina también resulta en un incremento de calcio intracelular, con lo cual se obtiene vasoconstricción. De esta manera se logran los efectos descritos al inicio. La activación del sistema nervioso simpático inicialmente es un importante mecanismo de compensación que se desencadena a partir de distintas situaciones estresantes como hipotensión, ejercicio y frío. Sin embargo en la enfermedad cardíaca su estimulación es persistente, ya que es una condición crónica y progresiva, lo que vuelve a este mecanismo maladaptativo (Uechi et al, 2002). Tanto en humanos (Davila et al, 2005) como en caninos con regurgitación de la válvula mitral inducida experimentalmente (Hankes et al., 2006) se determinó que la activación simpática aparece en etapas tempranas de la enfermedad, y que inicialmente se localiza en el corazón y el riñón, pero a medida que la enfermedad progresa se torna sistémico. En ese sentido, se ha descrito un aumento en la concentración de norepinefrina en el líquido intersticial miocárdico y en la sangre del seno coronario en caninos con falla mitral inducida experimentalmente (Farrell et al., 2001; Hankes et al., 2006). Mientras tanto, en caninos afectados con EDVM y cardiomiopatía dilatada de evolución natural, se detectaron concentraciones plasmáticas elevadas de norepinefrina (Ware et al., 1990). Esto es atribuido al progreso de la enfermedad cardíaca, ya que Uechi et al. (2002) encontró que los niveles plasmáticos de noradrenalina en caninos con regurgitación mitral leve eran comparables a los valores obtenidos de caninos sanos sometidos a estrés puntual. Sin embargo en el mismo estudio, los caninos con falla cardíaca (adquirida naturalmente) presentaron un incremento en la concentración de noradrenalina plasmática. Algunos autores (Ware et al., 1990; Yoshikawa et al., 1999) afirman que a pesar de este incremento, no existe correlación entre el aumento de la noradrenalina con el grado de disfunción miocárdica. Mientras tanto, otros indican que existe evidencia ecocardiográfica de disminución de funcionalidad contráctil (determinado a través de la disminución de la fracción de acortamiento) a mayores concentraciones de norepinefrina plasmáticas

(Santos et al., 2006). Vale aclarar que esta correlación inversa se aprecia en caninos con cardiomiopatía dilatada, no así en caninos afectados con EDVM ya que este índice aumenta con la progresión de la enfermedad como se explicará más adelante en el apartado de diagnóstico ecocardiográfico. Además se ha concluido que también se asocia el aumento de norepinefrina plasmática con el grado de insuficiencia cardíaca, siendo mayor en cuadros clínicos graves (Uechi et al., 2002; Santos et al., 2006). En medicina humana existe evidencia que involucra al aumento plasmático de epinefrina y norepinefrina con una sobrevida pobre (Cohn et al., 1984; Kaye et al., 1995). En caninos, Uechi et al. (2002) lo indican indirectamente, ya que asocian al aumento de la frecuencia cardíaca (producida por el tono simpático incrementado) con un pronóstico desfavorable. La persistencia de la elevación del tono simpático contribuye al deterioro cardíaco a través de múltiples procesos como hipertrofia de los miocitos, taquicardia constante, aumento de la demanda de oxígeno miocárdico, incremento de la poscarga, producción ineficiente de energía y pérdida de miocardiocitos por apoptosis y necrosis (Opie, 2002). Esto determina, además del desarrollo de disfunción ventricular izquierda, la aparición de arritmias. La fibrilación atrial es una de las arritmias que se puede producir tanto por estimulación del sistema simpático como por la estimulación del parasimpático. Por ser una arritmia de presentación frecuente en medicina humana (1-2 % de la población mundial) (Calkins et al., 2012) es que diversos trabajos han intentado descifrar su mecanismo de producción, concluyendo hasta el momento que son varios los componentes implicados (Smeets et al., 1986; Efremidis et al., 1999; Bettoni y Zimmermann, 2002; Pappone et al., 2004). Sharifov et al. (2004) produjeron fibrilación atrial en perros sanos al infundir acetilcolina, adrenalina e isoproterenol y concluyeron que la estimulación colinérgica fue principalmente quien desencadenó y mantuvo la arritmia, mientras que la estimulación adrenérgica moduló el inicio y mantenimiento de la fibrilación atrial previamente inducida por acetilcolina. Además de los efectos deletéreos cardíacos existen consecuencias desfavorables para otros órganos que se ven afectados por la disminución en el aporte de sangre determinado por la vasoconstricción periférica persistente. Los riñones pueden ser fuertemente perturbados, derivando en una azoemia pre renal. Afortunadamente, existen mecanismos homeostáticos diseñados especialmente para proteger los órganos esenciales, el encéfalo y el corazón. Ambos órganos pueden funcionar correctamente a pesar que la presión arterial caiga ya que poseen una autoregulación que les permite reducir su resistencia vascular ante una baja en el flujo sanguíneo, aunque este mecanismo falla si la presión arterial disminuye de 50mmHg (Levick, 1995).

4.1.3) *Activación del sistema renina angiotensina aldosterona*

El sistema renina angiotensina aldosterona es una respuesta del organismo para intentar contrarrestar la caída del gasto cardíaco y de la presión arterial. El descenso del gasto cardíaco estimula la liberación de renina, censado por el aparato yuxtaglomerular directamente como consecuencia de la disminución del flujo sanguíneo renal (de Morais y Schwartz, 2007). La liberación de renina es considerado el paso que limita la cascada del sistema en la mayoría de las especies, ya que la misma es sintetizada y almacenada en gránulos los cuales se disponen de manera controlada. Sin embargo, el angiotensinógeno es sintetizado por el hígado y generalmente está presente excesivamente en comparación a la renina. Cuando se presenta una o varias de las situaciones que determinan la liberación de renina (presión arterial baja, hipovolemia, disminución de la ingesta de sodio o estimulación simpática), la misma metaboliza el angiotensinógeno circulante y como resultado se crea la angiotensina I. Ésta es convertida a angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que es liberada a partir de las células endoteliales. La angiotensina II actúa en dos receptores denominados receptores de angiotensina tipo 1 y 2. A nivel de los receptores tipo 1 es que se desencadenan sus efectos de vasoconstricción, retención de sodio, estimulación de la sed, y liberación de aldosterona (Ames et al., 2019). Los receptores de angiotensina tipo 2 ejercen efectos contradictorios, ya que al ser estimulados conducen a respuestas anti inflamatorias, anti fibróticas y vasodilatadoras. Los receptores de angiotensina tipo 2 se reconocen como más abundantes en la vida fetal, colaborando en el desarrollo, para luego disminuir en el adulto sano. Sin embargo frente a determinadas patologías pueden estar incrementados (De Mello, 2014; De Mello, 2015). La aldosterona es la hormona terminal de este sistema, la misma genera retención de sodio y agua. Además aumenta la excreción de potasio y magnesio (Seelinger et al., 2005; Bader, 2013). La aldosterona actúa a través de los receptores de mineralocorticoides, los cuales se encuentran localizados ampliamente en el organismo (riñones, colon, glándulas salivares, cerebro, retina, miocardio, paredes de los vasos sanguíneos, adipocitos). Por este motivo se considera que su efecto es mucho más que el reconocido en los riñones, y si bien no está estudiado, se piensa que está relacionado con la inflamación y el metabolismo energético de los tejidos no epiteliales (Marzolla et al., 2014). Se ha demostrado que existe una producción local de péptidos de angiotensina y aldosterona en ciertos órganos como el cerebro, vasos sanguíneos, riñones y corazón. Estas hormonas presentan funciones importantes para el desempeño cardiovascular normal, pero también son mediadores del remodelamiento patológico, a pesar que para el caso de la aldosterona la producción local representa menos del 1% del total producido por las glándulas adrenales (Takeda et al., 1995). En resumen, la activación del sistema renina angiotensina aldosterona contribuye a la vasoconstricción y al aumento del volumen circulante por retención de sodio y

agua, lo que incrementa la poscarga y el consumo de oxígeno miocárdico (de Morais y Schwartz, 2007). La puesta en marcha de este sistema es compensatoria en los estadios iniciales de la enfermedad cardíaca y renal, sin embargo su activación crónica es considerada maladaptativa. Las consecuencias de la estimulación crónica de los receptores determina la aparición de los efectos deletéreos que se desencadenan por la activación crónica del sistema (Ames et al, 2019). La tabla 1 sintetiza y compara los principales efectos indeseados provocados por ambas hormonas (angiotensina II y aldosterona).

Tabla 1: Efectos adversos cardiovasculares y renales de la aldosterona y la angiotensina II.

Efecto adverso	Efecto directo de la angiotensina II	Efecto directo de la aldosterona
Remodelación miocárdica: Fibrosis, hipertrofia, necrosis apoptosis	Si	Si
Remodelación vascular: hipertrofia, fibrosis.	Si	Si
Arritmias	Si	Si
Pro inflamatorio (citoquinas, radicales libres)	Si	Si
Disfunción del endotelio vascular	Si	Si
Hipertensión sistémica	Si	Si
Daño glomerular y disfunción glomerular (proteinuria)	Si	Si
Daño tubulointersticial	Si	Si
Incremento del tono del sistema nervioso simpático	Si	Si
Inotropismo e aumento directo de la frecuencia cardíaca	Si	No
Retención de sodio y agua, congestión	Si	Si
Eliminación de potasio	No	Si
Sed	Si	No

Modificado de Ames et al, 2019.

4.2 Enfermedad degenerativa de la válvula mitral

4.II.1) *Introducción*

La enfermedad adquirida y crónica de las válvulas atrioventriculares es la causa más frecuente de enfermedad y mortalidad cardíaca en el perro (Pedersen y Haggstrom, 2000). Se estima que el 75% de todas las enfermedades cardíacas caninas corresponde a esta patología (Borgarelli y Haggstrom, 2010). Distintos términos son utilizados para definirla, como enfermedad degenerativa de las válvulas atrioventriculares, degeneración mixomatosa valvular o endocardiosis de las válvulas atrioventriculares (Fox, 2012; Gordon et al., 2017).

4.II.2) *Epidemiología*

La prevalencia de esta enfermedad es alta en razas de pequeño y mediano porte (Parker y Kilroy-Glynn, 2012), aunque también puede diagnosticarse en razas de tamaño grande (Borgarelli et al., 2004; O`Leary y Wilkie, 2009). Dentro de las razas más afectadas se encuentra el Cavalier King Charles Spaniel (CKCS), el Dachshund, el Poodle Yorkshire Terrier y Shih- Tzu (Olsen et al., 1999; Serfass et al., 2006; Borgarelli y Buchanan, 2012; Han et al., 2013; Meurs et al., 2019). Con respecto al sexo la presentación de ésta enfermedad es 1.5 veces mayor en machos (Reyes y Rodríguez, 2009; Tomé, 2012; Calderón et al., 2014; Keene et al., 2019). Así mismo, la edad es también un factor influyente y se considera que la prevalencia aumenta con la edad, ya que puede ocurrir en un 75% de los caninos de razas pequeñas cuando superan los 16 años de edad (Haggstrom et al., 2007), pudiendo ser superior en las razas predispuestas y alcanzando el 100% luego de los 11 años en el CKCS. Esta raza presenta un comportamiento diferente, ya que además puede presentar la enfermedad a edades tempranas pero afortunadamente el tiempo que lleva al desarrollo de falla cardíaca no parece ser menor al de otras razas pequeñas (Chetboul et al., 2004). Por el contrario cuando se afectan razas grandes, como por ejemplo el Ovejero Alemán, la progresión es más veloz que en las razas de porte pequeño (Borgarelli et al., 2004).

4.II.3) *Etiología*

La etiología no ha sido determinada aún (Gordon et al., 2017) y puesto que la degeneración de la válvula mitral es irreversible, sería fundamental poder conocer su causa para prevenirla. Se piensa que existe un mecanismo

genético de base, ya que determinadas razas están más predispuestas a padecer la enfermedad que otras. Las razas son esencialmente poblaciones cerradas y una vez que una mutación se desarrolla o es introducida se puede expandir a la población (Parker y Kilroy-Glynn, 2012). Tal es el caso del CKCS, y por este motivo la mayoría de los estudios genéticos fueron realizados en ésta raza. Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia y gravedad de la EDVM en los progenitores y sus crías a una edad determinada están asociados, y por lo tanto se ha sugerido que la enfermedad es hereditaria como un rasgo poligénico (Swenson et al., 1996). Además, existen registros en el Reino Unido, lugar de origen de estos caninos, acerca de la heredabilidad de la enfermedad (Lewis et al., 2010). Así mismo Madsen et al. (2011) identificaron dos Loci en el cromosoma 13 y 14 asociados al desarrollo de EDVM en caninos de ésta raza. Birkegard et al. (2016) realizaron un estudio donde efectuaron un esquema para la reproducción y cría del CKCS basados en la auscultación y la ecocardiografía por un período de 8 a 10 años, logrando una disminución significativa en la prevalencia de la enfermedad. Meurs et al. (2018) intentaron identificar si en caninos ocurrían las mismas mutaciones que en el equivalente de la EDVM de los humanos. Utilizaron Dachshounds y CKCS, pero no hallaron variantes en los genes estudiados. Además de lo expuesto anteriormente, la tendencia es tratar de identificar los estímulos que desencadenan las vías de señalización. Se piensa que puede tratarse de estímulos químicos o mecánicos. Estas vías controlan la expresión genética a través de los factores de transcripción (Orton et al., 2012). Entre los estímulos químicos se consideran sustancias circulantes en el plasma o liberadas por células circulantes en cercanía del corazón. Existe especial atención en la serotonina, la cual se ha demostrado como responsable de valvulopatía en humanos (Oyama y Levi, 2010). Además se especula que estímulos mecánicos pueden estar involucrados, ya que la EVMD está relacionada a una desregulación de la homeostasis de la estructura valvular. Las valvas están sometidas a varios tipos de fuerzas, y la tensión ha sido la que más protagonismo ha alcanzado. La hipertensión y los desórdenes hereditarios del tejido conectivo (como el síndrome de Marfan) son factores de riesgo conocidos para la enfermedad valvular en humanos (Singh et al., 1999; Boudoulas, 2003; Yosefy, 2007) e incrementan la tensión soportada por las cuerdas tendinosas, tanto por el aumento directo de la misma como por la debilidad estructural que provoca cada una, respectivamente (Orton et al., 2012). En ese sentido no hemos encontrado reportes similares en caninos.

4.II.4) Estructura valvular normal y cambios patológicos

4.II.4.1) Aparato valvular normal

El correcto funcionamiento de la válvula mitral depende de su estructura y función. El aparato valvular normal está compuesto por: la pared posterior del atrio izquierdo (AI), el anillo mitral, las dos valvas mitrales, las cuerdas tendinosas, los músculos papilares y la pared del ventrículo izquierdo asociada a estos (Tsakiris et al., 1971; Fenoglio et al., 1972). Este aparato tiene una interacción compleja que mantiene la integridad del mismo. Las valvas se denominan anterior (o septal) y posterior (o parietal), y se caracterizan por ser finas y transparentes (Fox, 2012) (Fig. 2). Ambas están ancladas al anillo mitral, el cual es una estructura fibrosa cuya forma y tamaño cambia durante el ciclo cardíaco (Glasson et al, 1996). El aparato sub valvular colabora con la retención de las valvas durante la sístole y la diástole del ciclo cardíaco (Yelin et al., 1981; Levine et al., 1995). Histológicamente las valvas son estructuras que están compuestas por cuatro estratos, los que son más evidentes en la porción media. Desde la parte atrial (superior) comienza con el atrialis, una fina capa de células endoteliales soportada por fibras de colágeno (dispuestas de forma difusa), fibras elásticas, fibroblastos y células musculares lisas. Le sigue la esponjosa, una capa rica en proteoglicanos y glucosaminoglicanos que envuelve colágeno, fibras elásticas y fibroblastos y células de Anichkov. La fibrosa es una capa densa de colágeno compacto con fibroblastos diseminados. Por último la ventricularis, una capa delgada similar a la atrialis pero sin miocitos (Fox, 2012) (Fig. 3).

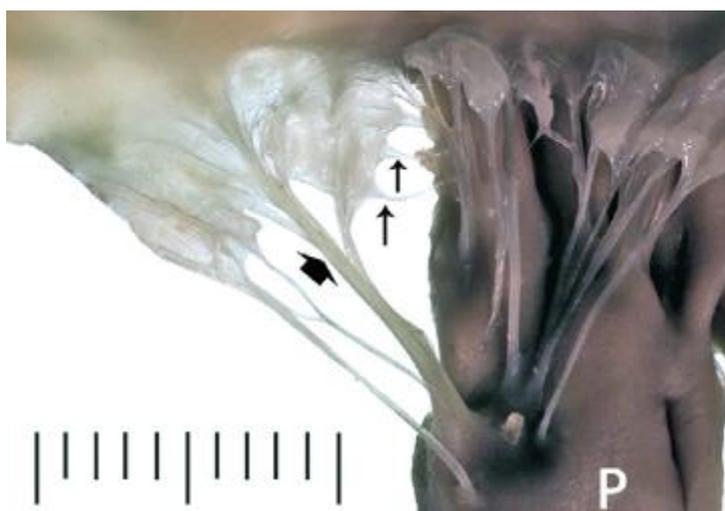


Figura 2. Vista dorsolateral de un aparato valvular normal canino. Las valvas son finas y traslúcidas. Estas se unen a las cuerdas tendinosas ventriculares (flecha gruesa) y marginales (flecha fina) las cuales se insertan en el musculo papilar (P). Escala en mm. Modificado de Fox (2012).

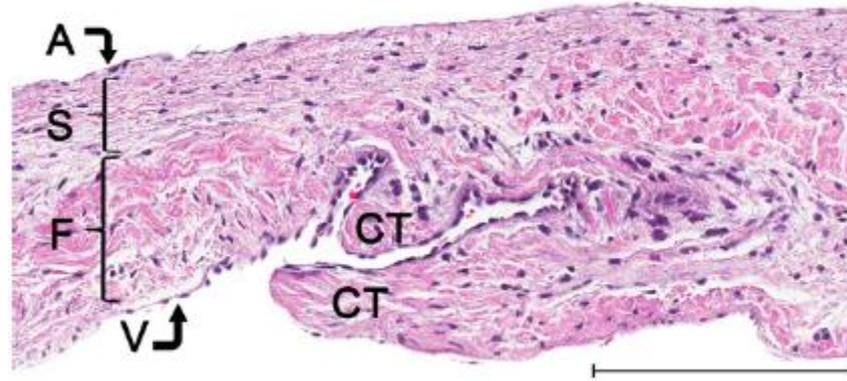


Figura 3. Fotografía de corte histológico del tercio proximal de la valva posterior de un canino sano. Se evidencian los 4 estratos que la componen: atrialis (A), esponjosa (S), fibrosa (F) y ventricularis (V). Escala: barra=200 μ . Modificado de Fox (2012).

4.II.4.2) Hallazgos patológicos

La severidad y la extensión de las lesiones de la EDVM dependen de la edad y varían ampliamente (Pedersen y Haggstrom, 2000; Han et al., 2010; Borgarelli y Haggstrom, 2010). Cuando los grados de lesión valvular son bajos o moderados la valva se afecta heterogéneamente, mientras que cuando el grado es severo aparecen zonas difusas de aumento del espesor. En los estadios iniciales las lesiones aparecen en el borde libre donde se enfrentan ambas valvas. La degeneración mixomatosa transforma las valvas finas y traslucidas en estructuras opacas en su tercio distal, que se engrosan, progresando a la aparición de nódulos y deformación (Fig. 4). Los nódulos pueden fusionarse a medida que la enfermedad progresa. En estadios avanzados los tramos engrosados pueden protruir dentro del AI (Fox, 2012). Estos cambios degenerativos también ocurren en las cuerdas tendinosas. Las mismas pueden engrosarse en la porción cercana a la inserción en la valva o en toda su extensión, otras veces pueden parecer excesivamente largas, pero es difícil de determinar si esto es un cambio patológico o una variación morfológica (Kogure, 1980). Se ha reportado una escala para valorar el grado de afectación según los nódulos, el engrosamiento y la deformidad presentes. Se clasifica en 4 tipos: las lesiones tipo 1 incluyen las valvas que presentan pequeños y pocos nódulos, generalmente en los lugares de coaptación valvar; las lesiones tipo 2 corresponden a las valvas que contienen nódulos mayores y que tienden a fusionarse en el borde libre de las mismas, y con áreas difusas de opacidad; las lesiones tipo 3 se caracterizan por valvas que poseen nódulos más grandes que se fusionan y adquieren apariencia de palcas irregulares, que

se extienden al extremo proximal de las mismas, y las lesiones tipo 4 generan una distorsión grave de las valvas y un adelgazamiento de la porción proximal de las cuerdas tendinosas (Whitney, 1967; Pomerance y Whitney, 1974). Este esquema provee una guía fácilmente interpretable, pero como la EDVM es una condición crónica que avanza constantemente generalmente los tipos de lesión se solapan y se dificulta colocar un paciente en una única categoría (Fox, 2012).

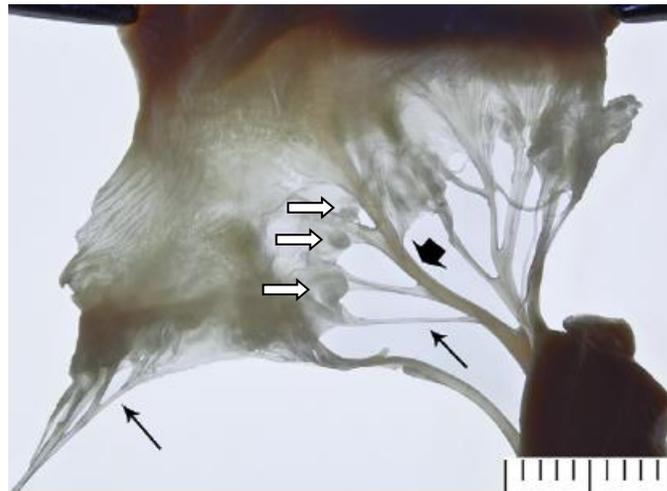


Figura 4: Aparato valvular de un canino afectado con EDVM. Se aprecian áreas de opacidad difusa valvar, y pequeños nódulos en el borde de la misma, evidenciados por las flechas blancas (lesiones Whitney tipo 1). Las flechas finas indican cuerdas tendinosas marginales y la gruesa una cuerda tendinosa ventricular. Escala mm. Modificado de Fox, 2012.

Los hallazgos histopatológicos varían según el grado de la degeneración valvular. Las lesiones predominan en el tercio distal de las valvas y la severidad aumenta con la edad. Las lesiones incluyen una expansión progresiva de la capa esponjosa y disrupción de la fibrosa (Han et al., 2013). Estos cambios pueden detectarse mayormente en la región de aposición valvar. La capa esponjosa se engrosa a expensas de un incremento en la matriz extracelular (Fig. 4). En casos de enfermedad moderada a severa la reducción en la densidad del tejido conectivo es muy importante, y empeora con el avance de la edad (Han et al., 2010).

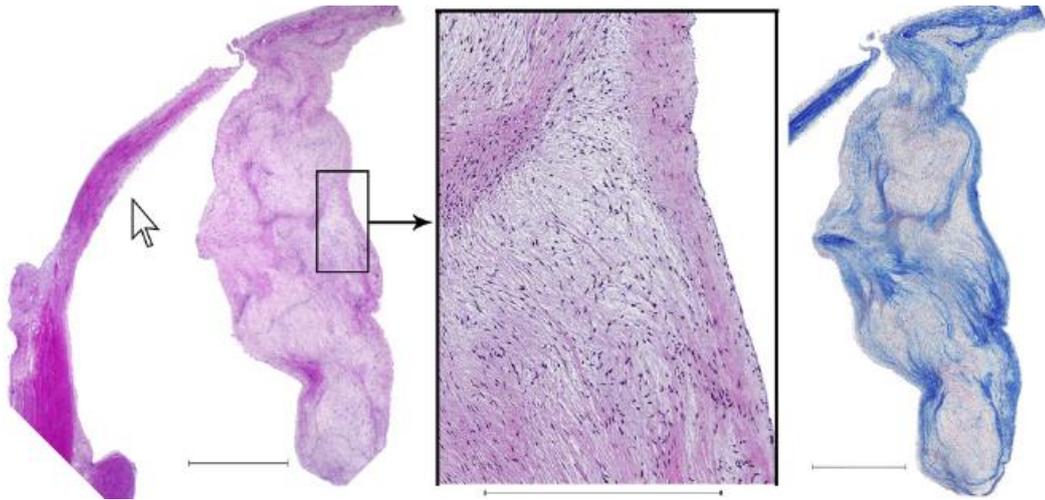


Figura 5. Fotografía de corte histológico de valva mitral de un canino afectado con EDVM en un estadio grave (lesiones Whitney tipo 4). La imagen central corresponde al aumento del rectángulo que figura en la foto de la izquierda. En el mismo se aprecia un aumento de espesor de la esponjosa debido al depósito de glucosaminoglicanos y proteoglicanos, así como una degeneración del estrato denominado fibrosa. Tanto la imagen de la izquierda (teñida con hematoxilina-eosina) como la de la derecha (teñida con tinción tricrómica de Masson) muestra como el colágeno ha perdido su organización laminar. Escalas: imágenes laterales barra=1mm, imagen central barra=500μ). Modificado de Fox, 2012.

4.2.5) Fisiopatología

Las lesiones anteriormente descritas desencadenadas por esta enfermedad traen como consecuencia una falla en la aposición valvar durante la sístole, lo que provoca un cierre ineficaz del aparato valvular con el consecuente reflujo sanguíneo hacia el AI. Las consecuencias dependen de varios factores, como el volumen regurgitante, la capacidad de adaptación del AI y de la vasculatura pulmonar, la reducción del gasto cardíaco, desarrollo de arritmias, y en el peor de los escenarios, la ruptura de las cuerdas tendinosas o la ruptura del AI. Ésta última determina la muerte inmediata del animal. Al inicio de la enfermedad, cuando la insuficiencia mitral es leve, no provoca cambios en la función cardíaca. El gasto cardíaco está mantenido y el volumen regurgitante se acopla al AI sin dificultad. Con la progresión de la enfermedad, el volumen regurgitante comienza a acentuarse, pero diversos mecanismos de compensación se ponen en marcha, y de esta manera se logra mantener el gasto cardíaco. La función sistólica está bien conservada porque la eyección hacia el AI no requiere trabajo excesivo ya que está a baja presión en ese momento del ciclo cardíaco.

No obstante la sobrecarga de volumen genera una hipertrofia excéntrica del ventrículo izquierdo, la cual es una remodelación patológica y como consecuencia se registra una caída de la contractilidad. El AI tiene un rol fundamental al recibir el exceso de volumen y proteger la vasculatura pulmonar y por lo tanto retrasar el desarrollo de hipertensión pulmonar. El aumento de la presión atrial izquierda genera congestión venosa pulmonar con el consecuente desarrollo de edema. Cuando la progresión de la enfermedad es lenta, la cronicidad del problema hace que el AI se adapte a recibir grandes volúmenes, retrasando el desarrollo de edema pulmonar. Además de éste mecanismo, la cronicidad colabora en la creación de un drenaje linfático pulmonar más eficiente por lo que también favorece que el pulmón se edematice mas tardíamente (Haggstrom et al., 2007).

El prolapso de la válvula mitral se refiere a una o ambas valvas curvándose dentro del AI durante la sístole, cuya presentación es frecuente en la EDVM. En un estudio realizado en 537 perros con EVDM que presentaban prolapso de la válvula mitral (Terzo et al., 2009) se determinó que la valva anterior es la que se afecta más frecuentemente (48,2%), mientras que ambas valvas estaban alteradas en un 44,3% de los casos. Además se encontró una fuerte correlación entre la severidad del prolapso y la intensidad del soplo. Los casos avanzados pueden desencadenar dos consecuencias de graves. La ruptura de las cuerdas tendinosas trae aparejado un incremento agudo e importante de la presión intra atrial, por lo que desarrollaría un edema agudo de pulmón. Si bien es un escenario complicado, no siempre determina la muerte súbita del animal. Un estudio que identificó ruptura de cuerdas tendinosas a través de ecocardiografía determinó que el 58% de los animales afectados sobrevivió más de un año (Serres et al., 2007). En cambio, la ruptura del AI como consecuencia de una EDVM severa por un traumatismo del endocardio a partir del “jet” de regurgitación genera un taponamiento cardíaco agudo, que si bien es fatal, afortunadamente es muy poco común de observar (Fox, 2012).

4.II.6) Diagnóstico y estadificación

4.II.6.1) *Clínica*

La EDVM se caracteriza por la presencia de un soplo sistólico de intensidad variable que se escucha mejor del lado izquierdo del tórax y hacia el ápex cardíaco. La intensidad del mismo se valora a través de una escala subjetiva que va del 1 al 6, siendo la máxima intensidad el de grado 6 (Kvart y Haggstrom, 2002). La intensidad del soplo se ha correlacionado en algunos estudios con la severidad de la enfermedad (Haggstrom et al., 1995; Ljunvall et al., 2007). En casos avanzados el soplo puede detectarse en un área mayor, que involucra también a la base y al hemitórax derecho. Esto puede deberse a

que con el progreso de la enfermedad el corazón se remodela y presenta agrandamiento atrial y ventricular izquierdo, o en casos menos frecuentes que esté afectada la válvula tricúspide concomitantemente (Borgarelli y Haggstrom, 2010). En estadios iniciales se puede evidenciar un click sistólico, que en el humano se considera indicador de prolapso mitral (Pedersen y Haggstrom, 2000). La presentación clínica es variable. Algunos pacientes no presentan sintomatología a excepción de la presencia del soplo con las características comentadas anteriormente. Otros pueden concurrir a consulta con episodios de tos y/o disnea, y en los casos más graves con dificultad respiratoria severa. Para unificar criterios de clasificación de los pacientes y establecer las bases del tratamiento Atkins et al. (2009) desarrollaron un consenso para la ACVIM (American College of Veterinary Internal Medicine), el cual fue actualizado en el 2019 por Keene et al. En ese trabajo se decidió clasificar a los animales en 4 categorías: La primera (estadio A) es para animales que están en riesgo de padecer la enfermedad, es decir las razas predispuestas, como lo son el CKCS y el dachshound. La importancia de esta categoría es poner en conocimiento de los veterinarios y criadores para realizar planes de cría que disminuyan la prevalencia de la enfermedad. El estadio B se reserva para aquellos animales que presentan un soplo con las características ya relatadas, pero sin sintomatología. Estos se dividen en B1 cuando no existe evidencia de remodelamiento cardíaco o existe remodelamiento leve y B2 cuando el remodelamiento es mayor (atrial y ventricular), esto se determina con una radiografía o un ecocardiograma. El estadio C es para los caninos que presentan o presentaron en algún momento síntomas clínicos de falla cardíaca, asociado a remodelamiento cardíaco. El estadio D es el que incluye a los pacientes cuya falla cardíaca es refractaria al tratamiento convencional (Atkins et al., 2009; Keene et al., 2019) (Tabla nº 2). Ésta es la clasificación que actualmente se utiliza, pero varias de las publicaciones consultadas en este trabajo se basan en otra anterior realizada por la International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC) en el año 1994. La misma será descrita en la Tabla nº 2 para facilitar la lectura.

Tabla 2: Clasificación de la insuficiencia cardíaca según American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)(Keene et al., 2019) y de la International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC, 1994).

ACVIM	Clase A Caninos sin enfermedad cardíaca pero con predisposición de padecerla (ej. Cavalier King Charles Spaniel, Caniche, Dachshound).	Clase B1 Caninos asintomáticos pero que presentan un soplo de regurgitación mitral, sin evidencias de remodelamiento cardíaco.	Clase C1 Caninos que presentan o presentaron en algún momento síntomas clínicos de falla cardíaca, asociado a remodelamiento cardíaco, con tratamiento hospitalario.	Clase D1 Caninos que presentan signos clínicos de falla cardíaca la cual es refractaria al tratamiento convencional, con tratamiento hospitalario.
		Clase B2 Caninos asintomáticos pero que presentan un soplo de regurgitación mitral, con evidencias de remodelamiento cardíaco.	Clase C2 Caninos que presentan o presentaron en algún momento síntomas clínicos de falla cardíaca, asociado a remodelamiento cardíaco, con tratamiento domiciliario.	Clase D2 Caninos que presentan signos clínicos de falla cardíaca la cual es refractaria al tratamiento convencional, con tratamiento domiciliario.
ISACHC		Clase Ia Caninos asintomáticos sin evidencia de remodelamiento cardíaco	Clase II Caninos que presentan sintomatología leve o moderada	Clase IIIa Caninos que presentan sintomatología importante, con posibilidad de tratamiento domiciliario
		Clase Ib Caninos asintomáticos con evidencia de remodelamiento cardíaco		Clase IIIa Caninos que presentan sintomatología importante, con indicación de tratamiento hospitalario

4.II.6.2) *Ecocardiografía*

Es el método de diagnóstico de elección para la EDVM. El consenso publicado por la ACVIM recomienda su realización a todos los caninos con sospecha de EDVM, ya que permite la estadificación de la enfermedad al determinar la existencia de remodelamiento cardíaco, y también permite diferenciar ésta enfermedad de otras causas de soplo mitral (Keene et al., 2019). En la evaluación de la EDVM se utilizan todas las modalidades ecocardiográficas para valorar la importancia del reflujo. A través del uso de la ecocardiografía bidimensional y el modo M podemos definir la morfología y estructura del aparato valvular. Ésta patología se caracteriza por la aparición de nódulos en el extremo de las valvas, así como el adelgazamiento de las cuerdas tendinosas, que empeora por la progresión de la enfermedad, como ya se describió anteriormente. También se puede evidenciar la existencia de prolapso valvular, que en general involucra la valva anterior, o rotura de cuerdas tendinosas (Chetboul y Tissier, 2012). El Doppler color es utilizado para evaluar el flujo regurgitante. Esto puede ser semi cuantitativamente al medir el porcentaje de la luz del AI ocupada por el espectro de colores creado por el reflujo. En medicina humana existe una clasificación de gravedad según ésta apreciación (Boon, 2011). Para determinar si existe remodelamiento cardíaco, lo inicial es evaluar el tamaño del AI ya que es la primera cámara cardíaca en sufrir modificaciones por la regurgitación crónica que padece. Para comprobar si existe agrandamiento del mismo se efectúa un corte transversal a nivel de la base cardíaca para comparar su tamaño con el de la Ao, y se calcula su relación (AI/Ao) (Hansson et al., 2002). Si éste cálculo supera 1,6 a favor del AI significa que éste sobrepasa el valor considerado normal (Keene et al., 2019) (Fig. 6).

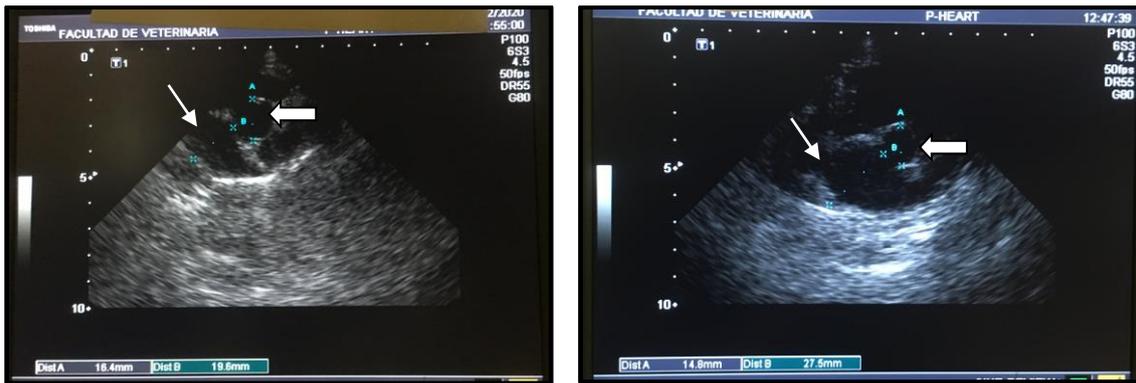


Figura 6. Imágenes ecocardiográficas en modo B obtenidas en un corte paraesternal derecho, ubicados en la base del corazón. En el centro de cada imagen se observa la aorta (Ao) (flecha gruesa) y debajo a la izquierda se visualiza el atrio izquierdo (AI) (flecha fina). Ambas estructuras son medidas para realizar el ratio AI/Ao, cuyo valor debe ser inferior a 1,5 para considerar que el AI mantiene las dimensiones normales. La primera imagen corresponde a un canino normal (ratio AI/Ao: 1,2), mientras que la segunda muestra un agrandamiento de AI importante (ratio AI:Ao: 1,85) en un canino con EDVM.

La función sistólica del ventrículo izquierdo se evalúa a través de la fracción de acortamiento (FA) y la fracción de eyección (FE). La fracción de acortamiento se define como el porcentaje del cambio en el diámetro radial del ventrículo izquierdo entre la sístole y la diástole, es determinada generalmente en modo M en un corte de ventrículo izquierdo realizado transversalmente a la altura de los músculos papilares (Fig. 7). La fracción de eyección representa el porcentaje de sangre que es eyectado del VI durante la sístole, se calcula a partir de las medidas tomadas en modo bidimensional usando una imagen en eje largo del ventrículo izquierdo. La falla cardíaca se caracteriza por una disminución en ambos índices, pero en el caso de la EDVM existen variaciones, ya que cuando se halla una regurgitación mitral importante se produce un aumento de la precarga del ventrículo izquierdo (porque existe un incremento en el volumen de sangre del AI por el flujo que proviene del ventrículo izquierdo debido a la falla mitral) y una reducción en la poscarga (porque parte de la sangre que debería salir por la Ao se escapa hacia el AI). Así es que el progreso de la enfermedad predispone a un movimiento hiperdinámico del ventrículo izquierdo, con elevación de la fracción de eyección y de la fracción de acortamiento (Bonagura y Schober, 2009; Chetboul y Tessier, 2012). Serres et al., (2009) realizaron un estudio en 77 perros con EDVM donde midieron la fracción de acortamiento y la fracción de eyección utilizando 3 métodos distintos, y descubrieron un incremento en estos índices. Por este motivo muchos autores coinciden en que valores normales de fracción

de eyección y fracción de acortamiento con un soplo de grado altos sugiere falla miocárdica sistólica (Bonagura y Schorber, 2009).

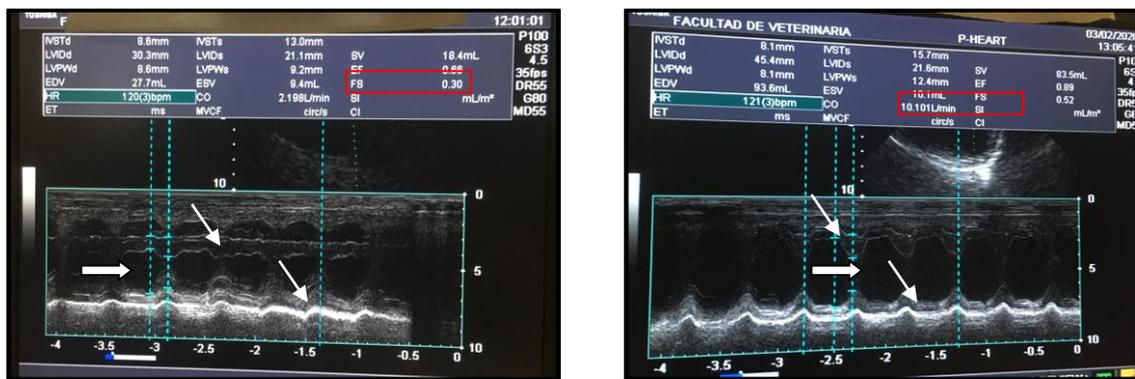


Figura 7. Imágenes ecocardiográficas en modo M obtenidas en un corte paraesternal derecho del ventrículo izquierdo a nivel de los músculos papilares. En este corte se realizan las medidas estandarizadas para luego calcular los índices de funcionalidad cardíaca. La primera imagen corresponde a un canino sano y la segunda a un canino con EDVM estadio C. Se observa un agrandamiento de la luz ventricular (flecha gruesa) así como un adelgazamiento de sus paredes (flechas finas), que corresponde al remodelamiento por sobrecarga de volumen característico de la enfermedad. La fracción de acortamiento es normal en el canino sano (30%), mientras que está aumentada en el canino con EDVM (52%) (Cuadro rojo).

4.II.6.3) Electrocardiografía

El electrocardiograma tiene un uso limitado en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Su utilidad radica en ser el método de elección para el diagnóstico de arritmias que puedan aparecer con el progreso de la enfermedad. Se considera un indicador insensible de dilatación cardíaca (Haggstrom et al., 2007). En ese sentido las variaciones que más frecuentemente se pueden encontrar en la EDVM son una onda P de 0,05 segundos de duración o más y con presencia de una muesca, lo cual se conoce como onda P mitral y corresponde a agrandamiento de AI. También podemos apreciar en estadios más avanzados de la enfermedad la presencia de complejos QRS de 0,07 segundos de duración y/o 2,5 mV de amplitud o

más, lo cual indicaría agrandamiento ventricular izquierdo (Coté y Ettinger, 2007) (Fig. 8).

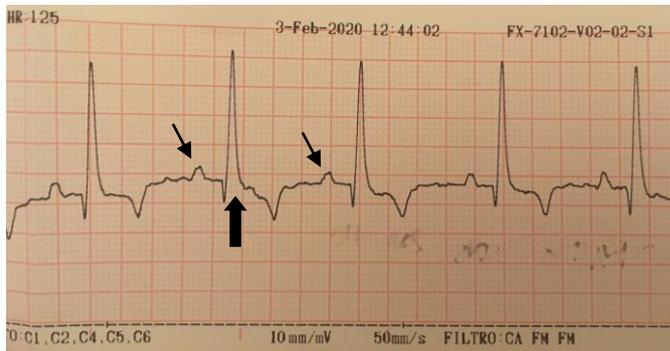


Figura 8. Registro electrocardiográfico obtenido en derivada II de un canino con EDVM en estadio C. Se observa onda P mitral (flechas finas) y agrandamiento ventricular determinado por un aumento en la duración del complejo QRS (QRS= 0,08 seg) (flecha gruesa).

Durante el inicio de la enfermedad generalmente se mantiene el ritmo sinusal normal o la arritmia sinusal respiratoria, que se considera fisiológica. Durante la progresión a falla cardíaca, el aumento de la frecuencia cardíaca por el estímulo simpático hace que la arritmia sinusal desaparezca (Rasmussen et al, 2012). López-Alvarez et al. (2014). Las arritmias cardíacas son poco comunes en perros al inicio de la EDVM, aunque se detectó un incremento en la aparición de arritmias supra ventriculares en dachshounds jóvenes enfermos con prolapso de válvula mitral (Olsen et al, 1999), y en perros adultos con agrandamiento de AI en etapas avanzadas (Crosara et al., 2010). La fibrilación atrial es una Además si bien no son habituales, la EDVM predispone a la aparición de arritmias ventriculares en perros que desarrollaron falla cardíaca. Las mismas suelen estar asociadas a estrechez arterial intramiocárdica, fibrosis intersticial miocárdica y a la débil función sistólica (Crossara et al., 2010; Falk et al., 2010).

4.II.6.4) Radiología

La mayoría de los pacientes que llegan a consulta cardiológica refieren tos, disnea y taquipnea como los principales síntomas. La población canina que está predispuesta a sufrir de EDVM es compartida con las enfermedades traqueobronquiales, las cuales manifiestan los mismos síntomas, por lo que escuchar un soplo de regurgitación mitral no significa que sea la etiología del problema (Keene et al., 2019). Por este motivo la radiografía de tórax se vuelve una herramienta fundamental, ya que puede valorar las consecuencias hemodinámicas de la EDVM como son agrandamiento cardíaco y presencia de edema de pulmón. Además permite realizar un diagnóstico diferencial con las principales enfermedades respiratorias (bronquitis crónica, colapso traqueal, etc.). Los signos principales de dilatación cardíaca izquierda que se pueden evidenciar en la proyección latero-lateral son: elevación dorsal de la tráquea, desplazamiento dorsal del bronquio principal izquierdo y prominencia del AI que genera una visión recta del borde dorsocaudal del corazón. También podemos observar cambios en la proyección ventro-dorsal o dorso-ventral que son sugestivos de agrandamiento cardíaco, como una protuberancia en la parte craneal izquierda, indicativa de dilatación atrial izquierda, así como una desviación del ápex cardíaco como consecuencia de dilatación del ventrículo izquierdo (Haggstrom et al., 2007). La escala cardiovertebral (VHS) se describió como un método objetivo para determinar la existencia de cardiomegalia. La misma fue descrita por Buchanan y Bucheler en 1995, y se basa en que existe una buena correlación entre el tamaño del corazón y la longitud corporal. Se utilizaron incidencias latero-laterales en 100 perros y 100 gatos sanos. El eje largo se determinó desde la carina hasta el ápex. El eje corto se tomó en el lugar más ancho en una línea paralela a la medida anterior. Ambas medidas se superpusieron a partir de la 4 vertebra torácica para determinar cuántas cuerpos vertebrales abarcan, por separado, para luego sumarlas (figura 9). De esta manera se concluyó que el valor normal en caninos es de $9,7 \pm 0,5$ cuerpos vertebrales (rango de 8,5 a 10,6). Debido a que se demostró que la gran variación en la conformación torácica que existe entre las distintas razas de perros puede arrojar resultados contradictorios (Lamb et al., 2000; Lamb et al., 2001), se realizaron revisiones específicas en ciertas razas como Beagles (Kraetschmer et al., 2008), Galgos (Marin et al., 2007), Whippets (Bavegems et al., 2005), Pugs, Pomeranians, Yorkshire Terriers, Dachshunds, Bulldogs, Shih-Tzus, Lhasa Apsos, y Boston Terriers (Choisunirachon y Kamonrat, 2008; Jepsent-Grant et al., 2012; Birks et al., 2017). Recientemente se describió un nuevo índice para determinar la presencia de agrandamiento de AI, denominado VLAS (Vertebral Left Atrial Size) (Malcom et al., 2018). Este método provee una estimación cuantitativa del tamaño del AI. Puede ser medido en las radiografías latero-laterales colocando una línea desde el centro del aspecto ventral de la carina hasta el punto más caudal del AI donde se intercepta con la vena cava caudal. Luego

esta medida se superpone a partir de la 4^o vertebra torácica, y si el valor supera los 2,3 cuerpos vertebrales indica agrandamiento de AI (figura 10).

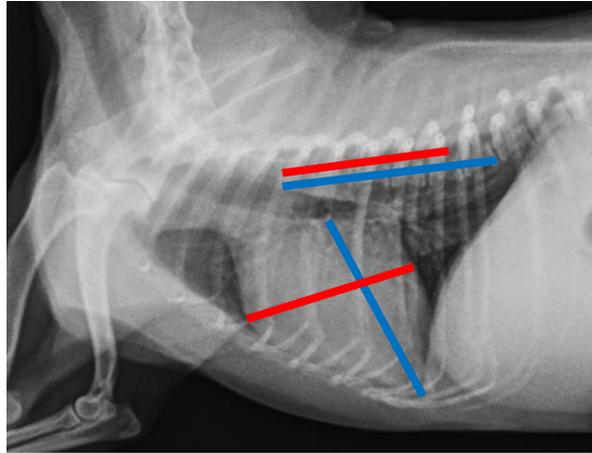


Figura 9: Vista lateral de radiografía de tórax de un canino con EDVM. Se realizó la escala VHS (vertebral heart score) con un resultado de 11 cuerpos vertebrales, lo cual se considera agrandamiento cardíaco.

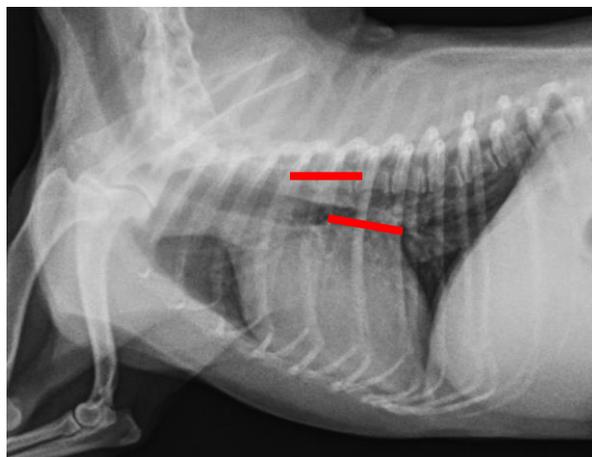


Figura 10: Vista lateral de radiografía de tórax de un canino con enfermedad degenerativa de la válvula mitral. Se realiza la escala VLAS (vertebral left atrium score) con un resultado de 2,1 cuerpos vertebrales. En este caso puede considerarse que no hay agrandamiento atrial.

4.II.6.5) *Presión arterial*

La medición de la presión arterial en pequeños animales puede ser desafiante. Según el último consenso de la ACVIM para la medición de presión arterial el único método avalado es la medición de presión invasiva (Acierno et al., 2018). Este método es muy poco práctico para la clínica diaria ya que se debe anestesiarse al paciente, contar con personal capacitado e infraestructura adecuada. Por este motivo se han desarrollado métodos indirectos. Los oscilométricos son los preferidos (Figura 11). Estos cuentan con un manguito el cual al ser insuflado detiene el pasaje de sangre para luego detectar el movimiento de la pared arterial cuando el flujo se retoma. Son aparatos muy sensibles y pueden arrojar resultados erróneos si el paciente se mueve o si presenta temblores. Si bien ninguno de los equipos disponibles ha sido validado, son de uso frecuente por su fácil manipulación y técnica, ya que se puede realizar en el momento de la consulta. La mayoría de los reportes en EDVM utilizan el método Doppler, cuyas desventajas incluyen que es un método más laborioso que el oscilométrico y que además solo permite obtener el valor de la presión sistólica (Borgarelli et al., 2007; Ljungvall et al., 2010; Petit et al., 2013). Cabe destacar que este método no ha sido validado por el consenso de la ACVIM (Acierno et al., 2018).



Figura 11: Imagen del procedimiento de medida de presión arterial con el dispositivo oscilométrico PetMap®.

4.II.6.6) *Hemograma*

Acercas del conteo de eritrocitos y la determinación del hematocrito se encuentra información contradictoria. En el estudio de Farabaugh et al. (2004) se determinó que si bien los valores de hemoglobina y hematocrito se

mantenían dentro del rango considerado normal en la mayoría de los perros con falla cardíaca, los mismos eran marcadamente inferiores que en el grupo de los controles. Mientras que Boswood y Murphy (2006) no encontraron diferencias significativas en el recuento de eritrocitos ni en el hematocrito de caninos en los diferentes estadios de la EDVM. Yu y Huang (2016) demostraron que la concentración de hemoglobina y el hematocrito disminuyen al aumentar la severidad del estatus funcional en perros con EDVM. Además, asociaron la presencia de anemia a un pronóstico pobre y puede ser considerada un predictor de mortalidad, lo cual coincide con lo encontrado en seres humanos. Aunque se desconoce cuál es el mecanismo exacto que la origina, se pudo determinar que una concentración de hemoglobina menor a 12,5 g/dl previo al tratamiento es un indicador de pronóstico pobre. Estudios en humanos han establecido que si se corrige la anemia se reducen los días de hospitalización y la necesidad de recibir diuréticos. Además mejora la clasificación funcional y la fracción de eyección (Silverberg et al., 2001). Esto no ha sido investigado en caninos. El recuento diferencial de leucocitos ha sido estudiado en seres humanos, en los cuales se reconoció que aporta valor pronóstico. Se determinó que aquellos pacientes que sufren infarto agudo de miocardio y presentan leucocitosis a predominio de neutrófilos, linfopenia y eosinopenia van a desarrollar falla cardíaca congestiva tempranamente (Cruz-Torres et al., 2011). Farabaugh et al (2004) observaron que el recuento de linfocitos en los caninos en estadio avanzado de falla cardíaca es menor en comparación con los perros sanos. Sin embargo el recuento total de leucocitos y de neutrófilos no superó el valor de referencia. Deepti y Yathiraj (2015) analizaron a 78 perros con signos de falla cardíaca y encontraron que la mayoría de los mismos se encontraban dentro de los rangos de referencia para todos los valores testeados ya que sólo 11 animales presentaron leucocitosis leve a moderada, es decir que comparte la tendencia de los otros trabajos pero en menor proporción. Un estudio reciente (Petric et al., 2018) afirma que los caninos en estadios más avanzados de falla cardíaca presentaron leucocitosis con neutrofilia en comparación a los sanos y a los pertenecientes a los grupos menos afectados. Este hallazgo indica que la inflamación sistémica estaría presente en la falla cardíaca grave. Los mecanismos por los cuales los leucocitos pueden afectar la progresión de la falla cardíaca incluyen daño proteolítico, obstrucción microvascular, inestabilidad eléctrica y revascularización anormal. Hamilton-Elliot et al. (2018) determinaron que en la mayoría de los perros con falla cardíaca que participaron del estudio, los valores se encontraron dentro del límite de referencia. Sin embargo consideran que existió neutrofilia y monocitosis relativa en comparación con el grupo control, y lo relacionaron al estrés que sufren los animales enfermos. Como puede apreciarse existen resultados contradictorios entre los distintos autores expuestos. Con respecto al recuento de plaquetas, es bien sabido que la agregación plaquetaria es el primer paso para la formación de trombosis arterial. En humanos los microtrombos plaquetarios pueden ocluir capilares en

el músculo cardíaco y desarrollar arritmias. En caninos con EDVM es común observar degeneración, necrosis y fibrosis del miocardio (Tanaka y Yamane, 2000). Las enfermedades que causan flujos turbulentos de alta velocidad como la EDVM podría causar activación plaquetaria (Brown et al., 1975). Se demostró en caninos con ésta enfermedad que las plaquetas pueden tener incrementada la respuesta de agregación (Olsen et al., 2001), con una vida media más corta (Tanaka, 2002) lo que indica un aumento en la actividad plaquetaria. El recuento de plaquetas resultó en trombocitopenia ($< 100 \times 10^9$) en un 16% de los CKCS con EDVM que participaron del estudio de Tong et al. (2016), aunque también se detectó agregación plaquetaria en un 50% de los caninos.

4.II.6.7) Biomarcadores Cardíacos

Péptido natriurético tipo B

Se han descrito 6 péptidos natriuréticos, de los cuales el péptido natriurético atrial (ANP) y el péptido natriurético tipo B (BNP) son los más relevantes desde la perspectiva de su utilidad como biomarcadores cardíacos. Ambos son producidos por el músculo cardíaco en respuesta a variados estímulos como la sobrecarga de volumen, hipertrofia e hipoxia. Además pueden ser secretados en conjunto con otros péptidos neurohormonales como la noradrenalina y la angiotensina II (Potter et al., 2009). Los péptidos natriuréticos son producidos como prohormonas (ej. proBNP), que son divididas por proteasas séricas específicas en un fragmento activo (C-BNP) y en uno inactivo (NT- proBNP). El fragmento activo se une a sus receptores que se encuentran en los riñones, pulmones, vasculatura y adrenales, y su acción comprende natriuresis y vasodilatación, además de efectos antifibróticos y antihipertróficos. Así contrarresta los efectos principales efectos del SRAA (vasoconstricción y retención de sodio). A medida que la enfermedad avanza, ambos sistemas incrementan su actividad, hasta que finalmente la eficacia del péptido natriurético disminuye (Oyama y Singletary, 2010). El C-ANP y el C-BNP cuentan con vidas medias cortas, ambos son degradados por endopeptidasas circulantes. Como ya se comentó éstos péptidos son sintetizados por el atrio, sin embargo durante la enfermedad cardíaca la producción ventricular de BNP se incrementa. El fragmento terminal NT-proBNP es más estable y su vida media es mayor, por lo que es el elegido para ser medido (Oyama, 2009). Oyama et al. (2008) determinaron una concentración de NT-proBNP significativamente mayor en los animales cardiopatas que en los sanos, y dentro del grupo de animales enfermos fue mayor en aquellos con falla cardíaca congestiva. Las enfermedades cardíacas y respiratorias

concomitantes son frecuentes de encontrar en animales gerontes. Por ese motivo la indicación más frecuente para realizar la determinación del NT-proBNP en caninos es en los casos donde se presentan signos de enfermedad respiratoria (Fine et al., 2008). En consecuencia se desarrollaron estudios con la intención de establecer valores de corte para los cuales se pueda definir si se trata de enfermedad respiratoria o cardíaca (Fine et al., 2008; Oyama et al., 2009). A partir de estos trabajos se determinó que los valores menores de 900 pmol/L son específicos para enfermedad respiratoria, y los mayores a 1800 pmol/L son específicos de enfermedad cardíaca, mientras que el intervalo entre estos (≥ 900 pmol/L - ≤ 1800 pmol/L) deben ser interpretados con cautela. Muchos autores afirman la utilidad del NT- proBNP como indicador de pronóstico, lo cual será discutido en el apartado correspondiente de este trabajo.

Troponinas

Dentro del cardiomiocito y formando parte de su compleja estructura diseñada para la contracción, se encuentran las troponinas. Consisten de 3 sub unidades que en conjunto se encargan de interrumpir la contracción, ya que regulan la unión al calcio y en consecuencia la relación entre los filamentos de actina y miosina (Oyama, 2015). La troponina T y la troponina I tienen isoformas específicas para musculo cardíaco y esquelético. La troponina I (TnI) no se expresa en el musculo esquelético durante la enfermedad, por lo tanto se considera específica del corazón. Como son proteínas intracelulares, no deberían estar presentes en la circulación, por lo que su detección en la sangre es indicativo de daño en el cardiomiocito (Adams et al., 1993; Kociol et al., 2010). Debido a su gran especificidad es el biomarcador de elección para diagnosticar un infarto agudo de miocardio en medicina humana, ya que en esta condición donde hay daño masivo y severo de los cardiomiocitos, la TnI se eleva considerablemente. Además existe evidencia que también aporta información sobre el pronóstico del paciente (Nagarajan et al., 2012). Si bien el infarto agudo de miocardio en caninos es raro, las enfermedades de evolución crónica como la EDVM es frecuente y en ese sentido la importancia de la determinación de la TnI es para efectuar el pronóstico (Oyama, 2015). El incremento de la TnI plasmática se expresa en caninos a medida que va aumentando la severidad de la enfermedad, lo cual se explicaría por un aumento en la muerte de los miocardiocitos que son afectados por el remodelamiento (Oyama y Sisson, 2004; Spratt et al., 2005; Ljungvall et al., 2010). Esto le otorga un valor pronóstico que será discutido más adelante.

4.II.6.8) Biomarcadores de inflamación sistémica

Proteína C reactiva

La proteína C reactiva pertenece al grupo de proteínas de fase aguda mayores, que se definen por aumentar 10 veces su concentración plasmática como consecuencia de procesos infecciosos o inflamatorios. Además este incremento puede registrarse en un corto periodo de tiempo, generalmente horas, desde la presencia del estímulo. Así mismo su vida media también es breve, por lo que luego de resuelto el problema, su concentración disminuye rápidamente. Estas propiedades, además que se encuentran en concentraciones mínimas en animales sanos, hacen que sean marcadores ideales. Las proteínas de fase aguda son sintetizadas en el hígado como respuesta a citoquinas proinflamatorias que están presentes en distintas enfermedades como: infecciones (virales y/o bacterianas), enfermedades inmunomediadas, neoplasia, injurias agudas a tejidos (cirugía, trauma), necrosis y quemaduras (Kjelgaard-Hansen y Jacobsen, 2011). Como biomarcadores cuantitativos pueden ser utilizados en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de la respuesta a la terapia. Estos biomarcadores son indicadores altamente sensibles de inflamación pero pobremente específicos (Ekersal y Bell, 2010). La medición de la proteína C reactiva es de uso habitual en medicina humana y ha sido estudiada últimamente para distintos padecimientos en caninos, dentro de los cuales se encuentra la enfermedad cardíaca, arrojando resultados discordantes. Rush et al. (2006) concluyeron que los caninos con falla cardíaca tienen concentraciones de proteína C reactiva más elevadas que los controles sanos. Posteriormente Ljungvall et al. (2010) describen que la proteína C reactiva medida en caninos con EDVM no se correlaciona con la severidad del cuadro clínico. Contradictoriamente Polizopoulou et al. (2015), que trabajaron con caninos con falla cardíaca originada por EDVM y los discriminaron según su gravedad, encontraron un aumento significativo al comparar el grupo de caninos con cuadro clínico leve con el cuadro clínico avanzado. Reimann et al. (2016) trabajaron con caninos en todas las etapas de la enfermedad, y encontraron que la concentración de proteína C reactiva estaba incrementada únicamente en el estadio C, es decir cuando presentan falla cardíaca. Estos datos concuerdan con Cunningham et al. (2012) que estudiaron acerca de la inflamación sistémica en caninos con insuficiencia cardíaca congestiva y concluyeron que animales con falla cardíaca avanzada presentan concentraciones de proteína C reactiva más altas, aunque el origen de la falla no fue exclusivamente la EDVM.

4.II.6.8) Biomarcadores renales

En medicina humana está bien establecido que las alteraciones cardiovasculares, cuyas principales consecuencias son la disminución del gasto cardíaco y la activación del sistema neurohormonal (SRRA), pueden afectar la función renal (Nicolle et al, 2007). Estudios en humanos afirman que aproximadamente el 21% de los pacientes con falla cardíaca que requieren hospitalización sufren además de enfermedad renal crónica (McClellan et al., 2004). En medicina veterinaria un estudio retrospectivo de caninos con EDVM estableció que la prevalencia de azotemia era alta en este grupo de animales y que aumentaba la severidad en los perros que desarrollaron falla cardíaca (Nicolle et al., 2007). Más recientemente se diseñó un consenso acerca de la clasificación, diagnóstico y tratamiento del síndrome cardiorenal (Pouchelon et al., 2015). Allí se indica que los principales biomarcadores séricos utilizados para detectar la enfermedad renal son la urea y creatinina. El principal inconveniente es que la creatinina posee baja sensibilidad y especificidad, ya que se va a encontrar por encima del valor de referencia una vez que el riñón ya perdió un 75% de su capacidad, y que puede verse incrementada en animales musculosos o con un exceso de carne en su dieta (Relford et al., 2016).

4.II.6.9) Hemostasia

En medicina humana los pacientes con falla cardíaca están asociados con alteraciones en la hemostasia, lo cual se conoce como estado protrombótico, que puede derivar en complicaciones como fenómenos oclusivos o tromboembólicos. Aunque el desarrollo de estos eventos clínicamente visibles es bajo, es posible que manifestaciones subclínicas contribuyan a la morbilidad y mortalidad de la enfermedad. Estos sucesos subclínicos como por ejemplo microinfartos han sido reconocidos como contribuyentes de la progresión de la falla cardíaca (Davis et al., 2000). La prevalencia de tromboembolismo clínicamente detectable es rara en perros con falla cardíaca congestiva, pero no existen estudios prospectivos que evalúen la ocurrencia de estos fenómenos. Dos estudios retrospectivos que se realizaron en perros con tromboembolismo pulmonar (Larue y Murtaugh, 1990; Johnson et al., 1999), y uno con trombosis de la vena cava craneal (Palmer et al., 1998) describieron la presencia de enfermedad cardíaca subyacente en una porción importante de los caninos estudiados, sugiriendo que algunas formas de trombosis en cardiología canina pueden ser fenómenos ocultos. Más aún el tromboembolismo oculto puede contribuir a la progresión de la falla cardíaca o producir la muerte por oclusión vascular. Tarnow et al. (2007) midieron 5 parámetros para identificar el estado procoagulante en caninos con falla cardíaca causada por EDVM y cardiomiopatía dilatada. Encontraron que el

fibrinógeno, el dímero D y el complejo trombina-antitrombina eran mayores en los caninos con falla cardíaca, así como la antitrombina y la proteína C estaban disminuidos, por lo cual concluyeron que efectivamente estos caninos presentaban un estado procoagulante, pero no se hizo una diferenciación según la patología de origen. Prihirunkit et al. (2014) evaluaron diversos marcadores de hemostasia en caninos con EDVM en diferentes estadios. Encontraron resultados similares a los de Tarnow et al. (2007) con incrementos significativos de fibrinógeno y dímero D y disminución de antitrombina y proteína C a medida que el estadio de la falla cardíaca era de mayor gravedad, en comparación con los caninos sanos. Sin embargo el número de caninos evaluados correspondientes al grupo más leve NYHA I (New York Heart Association), que se corresponde con el estadio B de la clasificación ACVIM y más grave NYHA IV, que se corresponde con el estadio D de la clasificación ACVIM, fue muy pequeño, siendo de 2 y 5 cada uno respectivamente. Además no se realizó una correcta selección del grupo control, ya que no se correlacionaron por sexo, edad o tamaño. Existe otro reporte realizado en CKCS debido a la gran predisposición que esta raza presenta para la EDVM. Los caninos involucrados estaban asintomáticos y se determinó que la concentración de fibrinógeno plasmático era mayor en los caninos enfermos (Tarnow, 2004).

4.II.7) Tratamiento

El tratamiento médico ha sido expuesto por un panel de especialistas en el consenso de la ACVIM (Keene et al., 2019). Estas recomendaciones varían dependiendo el estadio clínico en el que se encuentra el paciente. Aquellos que se encuentran en estadio B1 no tienen recomendación de iniciar medicación. Para los caninos que se presentan en estadio B2 se recomienda comenzar con pimobendan a dosis de 0.25-0.3 mg/kg cada 12 hs, ya que existen evidencias que en esta etapa pre clínica de la enfermedad la administración de esta droga contribuye a que el corazón reduzca su tamaño y mejore su función, (Boswood et al., 2018) prolongando el tiempo de la fase pre-clínica de la enfermedad en un año y medio (Boswood et al., 2016). También sería beneficioso el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), Pouchelon et al. (2007) concluyeron en su estudio que la administración de benacepril en este estadio de la enfermedad aumenta el período de tiempo previo al desarrollo de los signos clínicos. Sin embargo un estudio reciente (Borgarelli et al., 2020) concluyó que la administración de benacepril y espironolactona no prolonga la fase asintomática de la enfermedad, pero induce efectos benéficos en el

remodelamiento cardíaco. En los estadios clínicos C y D, cuando el animal muestra los clásicos signos de falla cardíaca congestiva (tos, disnea, intolerancia al ejercicio, entre otros) tendremos dos tipos de presentación: aguda y crónica. Cuando el cuadro es agudo, el objetivo del tratamiento es regular la hemodinamia y el aporte de oxígeno a los tejidos. Esto se cumple cuando se optimiza la precarga y la poscarga, la frecuencia cardíaca, la contractilidad y la oxigenación. Además es fundamental mejorar el gasto cardíaco y aliviar el cuadro clínico que pone en riesgo la vida del paciente, cuyo principal exponente es el edema agudo de pulmón (Keene et al., 2019). En estas circunstancias el uso de diuréticos es fundamental, y el furosemide es el recomendado. Se administra a dosis de 2 mg/kg I/V preferentemente, y se repite hasta que los signos respiratorios se resuelvan, o hasta que se alcance una dosis de 8 mg/kg en 4 horas. También si es necesario puede suplementarse oxígeno, administrar tranquilizantes para aliviar la ansiedad del paciente causada por la disnea, inótrupos positivos y vasodilatadores cuando el efecto de los diuréticos no es suficiente para controlar el edema pulmonar (Sabbah et al, 1993). El manejo crónico de la enfermedad incluye la administración de furosemide a dosis de 2 mg/kg cada 12 hs, o a la menor dosis necesaria para mantener el paciente sin disnea. El uso de enalapril o benacepril (0,25 – 0.5 mg/kg cada 12-24 hs) también se recomienda. La administración de enalapril resulto ser efectiva mejorando la clase de la insuficiencia cardíaca al disminuir la presión capilar pulmonar y colaborar con el control del edema pulmonar, además de contrarrestar parcialmente los efectos secundarios indeseados de la activación crónica del sistema renina angiotensina (Sisson, 1995; Woodfield, 1995). Cuando se alcanza el estadio final (D) los animales se vuelven refractarios al tratamiento. Generalmente necesitan dosis mas altas de furosemide, que superan los 8 mg/kg día. Se pueden añadir otros diuréticos, como la espironolactona. Además se puede incrementar la frecuencia de administración cada 8 horas de pimobendan. Algunos expertos recomiendan el uso de dosis bajas de digoxina (Keene et al., 2019), pero en este punto de la evolución de la enfermedad se convierten en pacientes difíciles de manejar.

4.II.8) Pronóstico

Los indicadores de pronóstico evaluados para esta enfermedad son múltiples, se han realizado numerosos estudios con distintas variables que van desde parámetros clínicos, estudios de imágenes y biomarcadores. El tiempo de sobrevida está estrechamente relacionado con el estadio clínico al momento del diagnóstico. Si se encuentra en la clasificación I de la ISACHC, la sobrevida del 60% de la población superó los 70 meses posteriores al diagnóstico

(Borgarelli et al., 2008), por este motivo es considerada un enfermedad de evolución benigna. En la misma línea, Serres et al. (2009) determinaron que si el paciente se encuentra en la clasificación II de la ISACHC la sobrevida era significativamente mayor que si se encontraba en la clase III de la ISACHC en la primera consulta. Así mismo, dos trabajos afirman que luego del inicio de la falla cardíaca congestiva, los parámetros a tener en cuenta a la hora de emitir un pronóstico son: la dosis necesaria de mantenimiento de furosemide, la intolerancia al ejercicio, el ratio existente entre el AI y la Ao, la concentración de creatinina sérica y la función sistólica (Borgarelli et al., 2008; Haggstrom et al., 2008). En el mismo estudio, Borgarelli et al. (2008) establecen que los caninos mayores a 8 años y aquellos que presenten soplos cardíacos de grado III o mayores se asociaron a tiempos de sobrevida menores. El sexo también es un indicador, siendo los machos quienes tienen peor pronóstico (Beardow y Buchanan, 1993). Además cuando se presentan complicaciones como fibrilación atrial, ruptura de cuerdas tendinosas e hipertensión pulmonar se evidencia una peor respuesta clínica (Haggstrom et al., 2007). Otros factores que predicen una progresión desfavorable son la presencia de taquicardia (frecuencia cardíaca mayor a 140 lpm), arritmias, síncope, disnea o ascitis (Buchanan, 1977; Egenvall et al., 2006; Serfass et al., 2006; Serres et al., 2007; Borgarelli et al., 2008). En relación a estudios de imagen, la literatura indica su valor desde hace décadas al utilizar las radiografías para evaluar el tamaño cardíaco (Halmin et al., 1968). Más recientemente Lord et al. (2011) describieron la utilidad de las radiografías para predecir el inicio de la falla cardíaca congestiva en caninos afectados con EDVM. Sin embargo, la ecocardiografía ha ganado importancia rápidamente y existen múltiples parámetros a tener en cuenta para predecir la evolución de estos pacientes. Los caninos que presentan grados altos de prolapso de las valvas, lesiones severas en las mismas y ruptura de cuerdas tendinosas presentan riesgo aumentado de descompensación y muerte (Serres et al., 2007, Terzo et al., 2009). Las consecuencias hemodinámicas que determinan un remodelamiento del corazón también pueden ser utilizadas como pronóstico. En varios estudios (Serres et al., 2007; Borgarelli et al., 2008; Serres et al., 2008) se determinó que las variables más concluyentes son la medición del AI y la relación AI/Ao; la medición del diámetro del ventrículo izquierdo en sístole y diástole y la determinación de la fracción de acortamiento. Un estudio acerca del agrandamiento cardíaco izquierdo (atrial y ventricular) causado por la EDVM sugirió que puede ser considerado como un factor pronóstico, ya que ocurre marcadamente durante el año previo al desarrollo de la falla cardíaca congestiva (Lord et al., 2010). Hezzel et al. (2012) demostraron que los rangos de cambio en el diámetro diastólico ventricular izquierdo, diámetro sistólico ventricular izquierdo, relación Ao/AI, ratio grosor de la pared libre ventricular izquierda/ diámetro ventricular izquierdo (entre otros) son mayores en los caninos con EDVM que mueren por causas cardíacas en un lapso de un año, comparado con caninos con EDVM que mueren por otras causas. Un estudio

posterior describe el potencial predictor de la funcionalidad del AI (Nakamura et al., 2014). Los biomarcadores también pueden utilizarse a la hora de emitir un pronóstico. La medición del NT-proBNP puede ayudar a predecir el inicio de la falla cardíaca en perros afectados con EDVM, así como su tiempo de sobrevida, ya que su concentración está relacionada a la severidad de la enfermedad (Chetboul et al., 2009; Serres et al., 2009; Tarnow et al., 2009; Reynolds et al., 2012). Según Moonamart et al. (2010) la medición del NT-proBNP y la medición del diámetro final del ventrículo izquierdo en diástole mediante ecocardiografía son predictores independientes de mortalidad. En el estudio de Serres et al. (2009) se concluyó que los caninos que se clasificaron como ISACHC clase 3, y que exhibieron una concentración de NT-proBNP mayor a 2700 pmol/L tuvieron una sobrevida muy breve, de 5 días. Los que presentaron concentraciones menores a ese valor, la sobrevida fue mucho mayor, superando los 6 meses. Así mismo Wolf et al. (2012) desarrollaron un estudio con 26 caninos con falla cardíaca y concluyeron que si existe una disminución del valor de NT-proBNP mayor a 965 pmol/l luego de iniciado el tratamiento, presentará una evolución favorable, aunque no lograron demostrar una sobrevida más larga. Además se intentó comprobar la variación biológica del NT-proBNP y de la Tnl para poder otorgarle un valor pronóstico más acertado. Ruaux et al. (2015) y Winter et al. (2016) concluyeron en sus estudios que tanto el NT-proBNP como la Tnl tienen valores de variación biológica individuales altos, aunque en ambos estudios se contó con pocos pacientes por lo que se recomienda continuar con la investigación. Con respecto a la Tnl hay reportes que indican que su concentración plasmática está aumentada en caninos con EDVM que se encuentran en etapas moderadas o severas de la misma (Ljungvall et al., 2010; Noszczyk – Nowak, 2011). También se desarrollaron estudios longitudinales, que determinaron que con la progresión de la enfermedad cardíaca se da un incremento en la Tnl, que se correlaciona con la severidad del cuadro clínico (Langhorn et al., 2014; Polizopoulou et al., 2014). Opuesto a lo declarado previamente, un estudio reciente (Chan et al., 2019) donde se realizaron determinaciones seriadas de Tnl en caninos afectados con EDVM, concluyó que los caninos cuyos valores disminuyeron sucesivamente desde la primer visita tuvieron mayor riesgo de muerte. Los autores atribuyeron esto al tratamiento que recibieron los animales. En cuanto a la proteína C reactiva existe menos información, ya que el interés en su determinación es más reciente. La mayoría de los trabajos publicados concuerdan en que su concentración es mayor en caninos con falla cardíaca (Cunningham et al., 2012; Polizopoulou et al., 2015; Reimann et al., 2016), pero no se han realizado estudios seriados hasta el momento.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EDVM es una patología en permanente estudio. Esto se explica en que además de ser la patología cardíaca más prevalente en caninos, existe interés como modelo para el desarrollo de nueva información de la enfermedad en humanos (Oyama et al., 2020; Suh et al., 2020). En la literatura, generalmente, los parámetros evaluados en los caninos involucrados en cada estudio son pocos. En la mayoría de los trabajos, además del punto central a investigar, se registran parámetros clínicos, ecocardiográficos, perfil renal (urea y creatinina); y con menor frecuencia radiología de tórax y medición de la presión arterial (Ljungvall et al., 2010; Winter et al., 2016; Chan et al., 2019; Meurs et al., 2019; Borgarelli, 2020). Es necesario pensar en el paciente como un todo, y que una enfermedad en cierto órgano o sistema inexorablemente repercutirá en otras partes del organismo. Existen múltiples publicaciones que indagan aisladamente las alteraciones provocadas en otros sistemas del canino afectado con EDVM. Sin embargo en numerosas oportunidades se hallan resultados contradictorios entre los distintos autores, que obligan a investigar datos propios (Farabaugh et al., 2004; Boswood y Murphy, 2006; Yu y Huang, 2016). En la última década se ha incrementado el estudio de los biomarcadores. Este interés radica en fabricar pruebas sencillas que el clínico pueda utilizar en el consultorio sin necesidad de recurrir a métodos laboriosos y costosos para el seguimiento de sus pacientes y realizar pronósticos más acertados. Tal es el caso del péptido natriurético tipo B (Chetboul et al., 2009; Serres et al., 2009; Tarnow et al., 2009; Moonamart et al., 2010; Reynolds et al., 2012), la troponina I (Ljungvall et al., 2010; Noszczyk – Nowak, 2011; Langhorn et al., 2014; Polizopoulou et al., 2014; Chan et al., 2019), y la proteína C reactiva (Polizopoulou et al., 2015; Reimann et al., 2016). Pero en general los artículos que las valoran y les otorgan su valor pronóstico pasaron por alto otras variables que pueden interferir con la eficacia del tratamiento y por lo tanto, con la supervivencia del animal, llevando a resultados que pueden ser inexactos. Por las razones anteriormente descritas, en el presente trabajo se optó por realizar una evaluación exhaustiva del paciente, considerando la mayor cantidad de variables a las que tenemos acceso y de esa manera ofrecer un tratamiento y un pronóstico más acertado. Además se realizaron técnicas que no son utilizadas en la región, y de las cuales la bibliografía existente proviene del hemisferio norte, con las diferencias que ello implica.

6. HIPÓTESIS

1. El avance evolutivo de la enfermedad degenerativa de la válvula mitral en caninos produce modificaciones en los parámetros clínicos, hematológicos y bioquímicos (sangre y orina) así como la aparición de marcadores de inflamación sistémica, que nos permite establecer un pronóstico certero de la misma.

2. Es posible establecer una asociación de los signos clínicos y los datos de presión arterial, radiografía de tórax, ecocardiograma y ECG con las modificaciones en los parámetros hematológicos y bioquímicos (sangre y orina) así como la aparición de marcadores de inflamación sistémica.

7. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la asociación de los parámetros clínicos, electrocardiográficos, radiológicos, y ecocardiográficos en enfermedad degenerativa de la válvula mitral en caninos, con parámetros hematológicos, bioquímicos (en orina y sangre) y marcadores sanguíneos de inflamación sistémica.

ESPECÍFICOS

1. Determinar los parámetros clínicos (frecuencia cardíaca, intensidad del soplo y presión arterial), electrocardiográficos, radiológicos y ecocardiográficos en animales con EDVM en estadio B y estadio C y en animales sanos.
2. Determinar si los parámetros hematológicos, bioquímicos (en sangre y orina), se modifican en animales con EDVM, y si difieren según el estadio (B o C) de la EDVM.
3. Valorar la concentración del marcador de inflamación sistémica (proteína C reactiva) y determinar si existen diferencias según el estado de salud del animal (Sanos, EDVM estadio B y EDVM estadio C).

8. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

El desarrollo de este trabajo incluyó 2 etapas. Por un lado, el diagnóstico y estadificación de la EDVM para luego realizar el resto de los estudios. Los pacientes en estadio B fueron diagnosticados y estadificados en la misma consulta. Si las condiciones lo aprobaban, se les tomaba la muestra de sangre y se le realizaba el resto de los estudios para luego comenzar la medicación. Si el animal no estaba en ayunas se citaba otro día para realizar todos los colaterales y luego se comenzaba con la medicación. Los caninos del grupo C, si concurrían a consulta por primera vez, eran medicados para luego ser citados para realizar el resto de los estudios colaterales. Aquellos que ya estaban en tratamiento se les citó para realizar todos los estudios correspondientes.

La segunda etapa consistió en la realización de los estudios de laboratorio, reunir esta información a la obtenida de los otros estudios (ecocardiograma, RX, ECG y PA) para ser procesada y evaluada estadísticamente como un todo.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos comprendidos en este estudio se realizaron en la Facultad de Veterinaria, UdelaR. Los procedimientos que involucraron animales contaron con el consentimiento de sus propietarios y se realizaron bajo la supervisión de los responsables de este proyecto.

9.1) *Animales*

El presente estudio incluyó caninos clínicamente sanos y enfermos con diagnóstico de EDVM, que asistieron a la consulta del Hospital de la Facultad de Veterinaria o de consultas particulares. Los animales clínicamente sanos (grupo control) se seleccionaron entre aquellos caninos cuyo motivo de consulta no estuvo vinculado a patologías clínicas (por ejemplo manejo, revacunaciones, etc.). A los propietarios de estos caninos se les explicó el proyecto de investigación y se les solicitó autorización para realizar la toma de muestras y estudios complementarios. Del total de caninos con diagnóstico de EDVM se realizó la estadificación de los mismos según las recomendaciones del consenso de la ACVIM (Keene et al., 2019) y se trabajó con los comprendidos en los grupos B y C. Corresponde hacer la aclaración que la toma de muestras para este trabajo comenzó antes de la publicación del último consenso ACVIM (Keene et al., 2019), en el cual se determina que para considerar un canino con EDVM en estadio B2 además de agrandamiento atrial izquierdo debe haber agrandamiento de ventrículo izquierdo, lo cual no se consideraba en el consenso ACVIM anterior (Atkins et al., 2009). Por lo tanto no nos es posible clasificar a todos los caninos incluidos en el grupo preclínico como B2 y lo denominamos B.

Los criterios de inclusión para este estudio fueron:

- Tamaño y condición corporal: Sabiendo que la enfermedad valvular mitral afecta predominantemente a animales de talla mediana y pequeña, los animales que participaron de este estudio presentaban un peso entre 2,5 y 15 kg. No se discriminó por razas. A su vez se trabajó únicamente con perros de condición corporal ideal, considerada como 4 ó 5 en la escala de 9 puntos (Nestlé, Purina).
- Sexo: Se intentó lograr un ratio (machos: hembras) 1:1, pero conociendo que la enfermedad tiene mayor prevalencia en machos (1.5:1) (Keene et al., 2019) se aceptaron variaciones. No se consideró si estaban esterilizados o no, pero no se aceptó estados de preñez o lactancia al momento de la toma de muestras.

- Edad: Se trabajó con animales adultos, en un rango de 6 a 15 años de edad, considerando que la enfermedad valvular mitral afecta mayormente a perros en edad avanzada.

Los criterios de exclusión fueron la detección de enfermedades concomitantes o el incumplimiento por parte de los propietarios de realizar.

Los animales incluidos en el grupo correspondiente al estadio B comenzaron a recibir medicación luego de realizados los estudios (si así lo requerían). Los incluidos en el estadio C podían corresponderse a ingresos por primera vez o a animales en tratamiento. Si en la primera consulta estaban dadas las condiciones necesarias (ayuno para tomar las muestras de sangre, estabilidad del paciente para ser sometido a los estudios de imagen), las pruebas se realizaban antes de recibir medicación. La medicación que recibían los animales en estadio C que estaban en tratamiento al momento de realizados los estudios consistía en IECAs (enalapril o benacepril), pimobendan, furosemide y/o espironolactona.

A todos los animales incluidos en este estudio se les realizó las evaluaciones clínicas y estudios detallados a continuación.

9.II) *Evaluación clínica cardiológica*

La evaluación clínica cardiológica consistió en: evaluación de coloración de mucosas y tiempo de llenado capilar, medición de frecuencia cardíaca y respiratoria, evaluación del pulso, auscultación cardíaca y pulmonar. En los casos en que se evidenció la presencia de soplo, el mismo fue clasificado según la escala de intensidad (del 1 al 6), siendo el 1 el de mínima intensidad, aumentando gradualmente hasta el 4 que refiere máxima intensidad sin presencia de frémito. El grado 5 y 6 incluye soplos con frémito palpable, siendo el grado 6 el de máxima intensidad (Kvart y Haggstrom, 2002).

9.III) *Radiografía*

Las radiografías de tórax consistieron en dos incidencias (latero-lateral y dorso-ventral), realizados en un aparato Vetter Rems. No se administraron drogas tranquilizantes. Se evaluaron las distintas estructuras presentes, con especial enfoque en el corazón y en los pulmones para establecer si existía edema. Se determinó si su tamaño estaba dentro de los límites normales a través de la escala cardio vertebral (VHS) (Buchanan y Bucheler, 1995) y si existía agrandamiento del AI utilizando la escala VLAS (vertebral left atrial size) (Malcom et al, 2018).

8.IV) *Ecocardiograma*

El estudio ecocardiográfico se efectuó con un aparato Toshiba Nemio, con una sonda microconvexa de 5,5 MHz. Los caninos fueron preparados como lo son habitualmente para la correcta realización de la técnica ecocardiográfica: depilación a ambos lados del tórax, en el área cardíaca, aplicación de alcohol y gel conductor sobre la piel. No se administraron tranquilizantes durante el procedimiento. Primero se realizó desde la ventana paraesternal derecha, para lo cual se utilizó una camilla adaptada que presenta una escotadura de forma que, con el canino en decúbito derecho, es posible apoyar la sonda sobre el lado derecho del tórax. Este abordaje corresponde al ecocardiograma estandarizado, en modo B y M descriptos para el perro (Thomas et al., 1984; O'Grady et al., 1986; Thomas et al., 1995; Boon, 2011). En modo B, mediante un corte ecocardiográfico transversal de la base cardíaca, se midió el anillo aórtico y la cavidad del AI. Con las medidas obtenidas se calculó la relación AI/Ao para determinar si existe agrandamiento atrial izquierdo. En modo M, mediante corte ecocardiográfico transversal del VI a la altura de las cuerdas tendinosas, se midieron las dimensiones de la cavidad ventricular izquierda, espesor del septum y de la pared libre del ventrículo izquierdo en sístole y en diástole. Cada medida se realizó tres veces para luego ser promediada. A partir de los diámetros en sístole y en diástole del VI, se calculó la fracción de acortamiento (Boon, 2011). Todos los valores fueron normalizados para el peso vivo del animal, utilizando las formulas descritas por Cornell et al. (2004). Las mismas se obtienen dividiendo el valor del parámetro ecocardiográfico entre el peso vivo elevado a una potencia, la cual es diferente para cada parámetro ecocardiográfico (Tabla 3). Por ejemplo, en el caso del diámetro del ventrículo izquierdo en diástole la formula sería la siguiente: $LVIDD / (\text{peso vivo}^{0,294})$.

Tabla 3. Potencias a las cuales se elevó el peso vivo de cada animal para normalizar los valores ecocardiográficos obtenidos (adaptado de Cornell et al., 2004).

Parámetro	Potencia	Valor estimado
LA	0,345	0,90
Ao	0,341	0,89
IVSTD	0,241	0,52
IVSTS	0,240	0,71
LVIDD	0,294	1,73
LVIDS	0,315	1,14
LVWD	0,232	0,53
LVWS	0,222	0,78

LA, atrio izquierdo; Ao, aorta; LA/Ao, ratio atrio izquierdo/aorta; IVSD, septum en diástole; IVSS, septum en sístole; LVIDD, diámetro del ventrículo izquierdo al final de la diástole; LVIDS, diámetro del ventrículo izquierdo al final de la sístole; LVWD, pared libre del ventrículo izquierdo en diástole; LVWS, pared libre del ventrículo izquierdo en sístole.

9.V) *Electrocardiograma*

El electrocardiograma se realizó en un equipo Fukuda modelo Denshi. No se administraron drogas tranquilizantes. Con el paciente en estación se colocó alcohol en la región axilar en inguinal de cada miembro para luego situar los electrodos. Se registraron las seis derivadas (I, II, III, aVR, aVL y aVF) con una sensibilidad de 1 cm= 1 mV y con una amplitud de 25 mm/seg. Se determinó el ritmo, frecuencia cardíaca y parámetros (medición de ondas, segmentos e intervalos) en cada caso (Kittleson y Kienle, 2000).

9.VI) *Medición de presión arterial*

Se obtuvo la presión arterial (sistólica, diastólica y media) con un equipo oscilométrico (pet-Map Graphic, Ramsey Medical Inc., FL. USA) (Rattez et al., 2010; Tebaldi et al., 2012; Bigby et al., 2017) y siguiendo los lineamientos propuestos por el consenso de la ACVIM (Acierno et al, 2018). Se preparó una sala en la cual el animal esperó junto a su propietario aislado de ruidos externos. La medida fue realizada en el miembro anterior derecho, para esto se eligió un manguito cuyo ancho correspondiera a un 30-40% de la circunferencia del miembro. La primera medida fue descartada, luego se realizaron 7 más las cuales fueron promediadas para obtener los valores finales de presión arterial sistólica, diastólica y media.

8.III) *Toma de muestras de sangre*

Las muestras de sangre se extrajeron de la vena cefálica, con agujas 21G. Dichas muestras se colocaron en tubos con EDTA para la realización de hemogramas y de los biomarcadores, en tubo con citrato de sodio para pruebas de coagulación y en tubo seco para la determinación de la bioquímica. Las muestras de sangre para bioquímica y biomarcadores fueron centrifugadas por 15 minutos a 1500g a temperatura ambiente. Luego el sobrenadante (suero ó plasma) fue alicuotado en tubos Eppendorf y colocado a -80°C dentro de los 30 minutos de obtenida la muestra.

9.VII) *Análisis hematológico*

El hemograma fue realizado en un contador hematológico automatizado (Mythic 18 Vet Hematology Analyser, Orphée). Paralelamente se realizó un frotis sanguíneo al momento de recibida la muestra, se coloreó con la técnica de May Grunwald - Giemsa y fue utilizado para realizar el conteo diferencial de leucocitos así como para la evaluación de la morfología celular, mediante su observación en el microscopio por los técnicos del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria.

9.VIII) *Bioquímica sérica*

La bioquímica sérica consistió en la determinación de: perfil renal (urea y creatinina); perfil hepático que incluye albúmina, proteínas totales, colesterol, fosfatasa alcalina sérica (FAS), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST); ionograma (sodio y potasio). Esto se midió a partir del

suero en un equipo semiautomático, CB 350i (Wiener lab Group). Las pruebas para evaluar la coagulación consisten en tiempo de protrombina (TP), tiempo de protrombina parcial activado (TTPA) y fibrinógeno. Las mismas se realizaron en el equipo Cor 50 (Wierner lab). Los rangos de referencia utilizados fueron proporcionados por el laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Veterinaria y a partir de ellos se definieron anomalías.

9.IX) *Proteína C reactiva*

Para la determinación de la Proteína C Reactiva se utilizó un kit de ELISA para caninos (Tridelta Phase Range CRP – Canine Assay, Tridelta Development Ltd, County Wicklow, Ireland), previamente validado (Kjelgaard-Hansen et al., 2003), siguiendo las indicaciones del laboratorio de origen. Los resultados fueron obtenidos en el equipo Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific) (Figura 12).

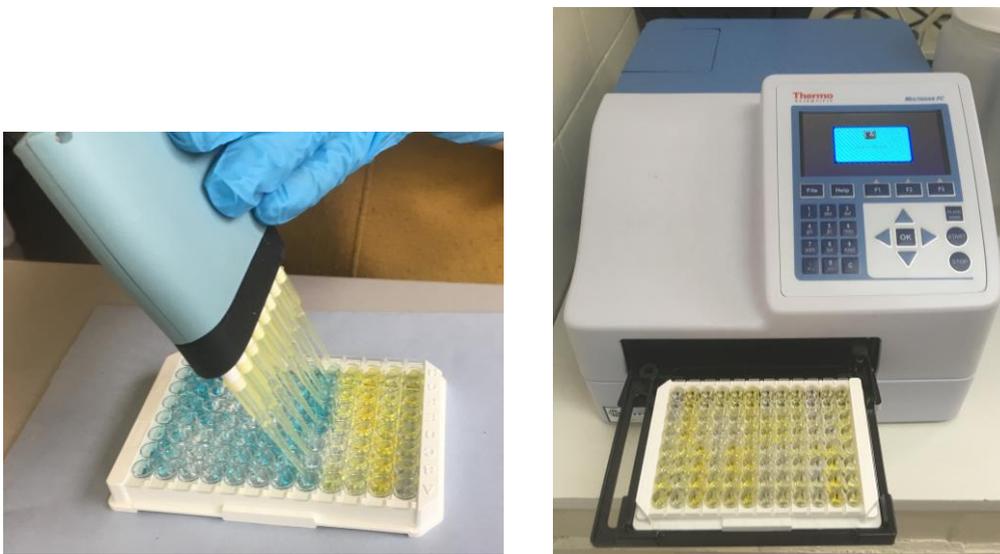


Figura 12: Realización del test de ELISA para determinar la proteína C reactiva.

8.XI) *Orina*

Con la colaboración de los propietarios se obtuvo una muestra de la primera orina del día, en un envase limpio. Se procedió en el laboratorio de Facultad de veterinaria determinar de la densidad urinaria mediante refractómetro clínico manual y además se cuantificó la proteinuria en un equipo semi-automático CB350i (Wiener Lab).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis univariado (Proc Univariate, Statistical Analysis system, SAS), en todas las variables para identificar los valores atípicos y verificar la normalidad de los residuales. Las variables (linfocitos, monocitos y eosinófilos) no presentaron una distribución normal por lo que se realizó una transformación logarítmica de los valores.

Para el análisis de todas las variables se utilizó el procedimiento mixto (Proc Mixed, Statistical Analysis System, SAS), incluyendo en el modelo el status clínico (sanos, estadio preclínico y clínico), como efecto fijo.

Se utilizó el test de tukey para analizar diferencias entre grupos en todas las variables estudiadas. Los datos se presentan como promedios \pm SEM. El nivel de significación fue $P < 0.05$ y los valores de P comprendidos entre 0.05 y 0.10 se consideraron como tendencia.

11. RESULTADOS

En este trabajo se seleccionaron inicialmente 47 caninos, debiéndose descartar 4 animales del grupo de los enfermos clínicos (C) y 5 sanos al constatar que presentaban patologías adicionales luego de realizados los estudios. Los animales que cumplieron con los criterios de inclusión fueron 38 caninos (EDVM estadio subclínico B, n=10; EDVM estadio clínico C, n=14; y sanos, n=14). La edad promedio al momento del diagnóstico en los subclínicos (B) fue 11,6 años (rango 7-15 años), en los clínicos (C) 11,9 años (rango 9-15 años), en los animales sanos el peso promedio fue de 8,6 años (rango 7-12 años). La proporción de hembras y machos en cada grupo fue similar (Tabla 1). El grupo de pacientes sanos estuvo conformado por 8 hembras y 6 machos. El grupo B incluyó 4 perros mestizos, 3 de raza caniche, 2 shih-tzu, 1 dachshound y 1 yorkshire. El grupo C estuvo integrado por 5 caniches, 4 mestizos, 3 yorkshire, 1 shih-tzu y 1 dachshound. Al grupo sano lo conformaron 8 perros mestizos, 4 caniches, 1 dachshound y 1 yorkshire. El peso vivo varió entre los grupos, presentando los animales en estadio clínico menor peso que los sanos y una tendencia a ser menor que los del estadio subclínico; siendo consistente con las razas incluidas en cada grupo.

11.1) *Parámetros clínicos*

La frecuencia cardíaca presentó diferencias según el estado de salud del animal ($p=0,01$) siendo menor en el grupo sano al compararlo con el B y con el C. Sin embargo, no hubo diferencias entre el B y el C. El color de las mucosas no registró diferencias entre grupos. El grado de soplo mostró diferencias ($p<0.001$), aumentando a medida que progresa la enfermedad. No hubo efecto de grupo en la medición de la presión arterial sistólica, diastólica, ni media. Sin embargo, al realizar comparaciones por el test de mínimas diferencias, la presión arterial sistólica tendió a ser mayor en los grupos sano ($p=0,09$) y B ($p=0,08$) que en el C, y la presión arterial media tendió a ser mayor en el grupo B que en el grupo C ($p=0.07$) (Tabla 4).

Tabla 4: Características de los animales y parámetros clínicos (Promedio± Error Estándar).

Parámetros clínicos	Sanos	Estadio subclínico (B)	Estadio clínico (C)
Número	14	10	14
Peso vivo (kg)	10,1±1,0 ^a	9,1±1,1 ^{abx}	6,1±1,0 ^{by}
Sexo (H/M)	8/6	5/5	7/7
Raza	Mestizo, caniche, dachshound, yorkshire terrier	Mestizo, caniche, shih-tzu, dachshound, yorkshire terrier	Caniche, mestizo, yorkshire terrier, shih-tzu, dachshound
Edad (años)	8,6±0,6 ^a	11,6±0,7 ^b	11,9±0,6 ^b
FC (lat/min)	127,1±5,1 ^a	144,0±6,1 ^b	150,0±5,1 ^b
Grado de soplo (1-6)	0±0,1 ^a	2,5±0,1 ^b	3,9±0,1 ^c
Mucosas	Normocrómicas	Normocrómicas	Normocrómicas
PS (mmHg)	176,3±5,2 ^x	178±6,1 ^x	164,0±5,2 ^y
PD (mmHg)	91,9±3,4	98,5±4,0	91,6±3,4
PM (mmHg)	120,5±3,4 ^{xy}	125±4,0 ^x	115,9±3,4 ^y

a vs b vs c $p < 0,05$; x vs y $p < 0,1$. FC, frecuencia cardíaca; PS, presión arterial sistólica; PD, presión arterial diastólica; PM, presión arterial media.

11.II) Radiografía, ecografía y electrocardiograma

Del estudio de las radiografías de tórax surge que la escala VHS fue mayor en el grupo C con respecto a los animales sanos ($p=0,01$) y al grupo B, no existiendo diferencias entre los animales sanos y subclínicos (B). La escala VLAS presentó diferencias entre grupos ($p < 0,001$), siendo mayor a medida que progresa la enfermedad (Tabla 5).

En la evaluación ecocardiográfica de los grupos, la medida del AI presentó una tendencia a ser mayor en el grupo B, mientras que el diámetro aórtico no presentó diferencias entre los distintos grupos. El ratio AI/Ao (atrio

izquierdo/aorta) presentó diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.001$), aumentando con el progreso de la enfermedad. De las medidas ecocardiográficas tomadas (normalizado por peso vivo), la mayoría de las mismas (IVSDn, IVSSn, LVIDSn, LVPWDn) no presentaron diferencias por grupos. Para el LAn existió una tendencia a ser mayor el grupo C al compararlo con el sano ($p = 0,052$). Así mismo hubo efecto del grupo en la medida del LVIDDn ($p = 0,026$), siendo mayor en el grupo C al compararlo con el sano, y con tendencia a ser mayor el grupo C al compararlo con el B ($p = 0,07$). La LVPWSn tendió a ser mayor en el grupo C al compararlo con el sano, sin registrar diferencias en el resto de las comparaciones entre grupos. Hubo un efecto del grupo en el valor de la FA ($p = 0,0014$). No existieron diferencias entre sanos y preclínicos (B), sin embargo este índice fue mayor en los enfermos clínicos (C) al compararlos con los B y con los sanos (Tabla 5).

La medición de la onda P del electrocardiograma en duración fue diferente entre los grupos ($p < 0.001$). En el grupo C fue superior que en el sano, así mismo fue mayor al compararlo con el B. No se registraron alteraciones entre el grupo sano y el B. Al determinar la amplitud de la onda P no se encontraron diferencias entre los distintos grupos. La duración del complejo QRS registró diferencias según el grupo al que pertenecían los animales ($p = 0,01$). El grupo C presentó valores mayores que el grupo B y que el grupo sano, sin embargo no existió variación entre los animales sanos y los B. No se detectaron modificaciones asociadas a los grupos al analizar la amplitud del complejo QRS, salvo una tendencia al comparar el grupo sano con el C ($p = 0,07$) (Tabla 5).

Tabla 5: Medidas e índices (Promedio \pm Error Estándar) de las variables de radiología, ecocardiograma y electrocardiograma.

Parámetros	Sanos	Preclínicos (B)	Clínicos (C)
VHS	10,5 \pm 0,2 ^a	10,7 \pm 0,2 ^a	11,3 \pm 0,2 ^b
VLAS	1,9 \pm 0,08 ^a	2,3 \pm 0,1 ^b	2,6 \pm 0,08 ^c
LA (mm)	20,1 \pm 1,9 ^x	26,4 \pm 2,3 ^y	21,9 \pm 1,9 ^{xy}
Ao (mm)	18,1 \pm 1,3	19,6 \pm 1,6	17,6 \pm 1,3
LA/Ao	1,16 \pm 0,05 ^a	1,60 \pm 0,05 ^b	1,82 \pm 0,05 ^c
LA n	0,84 \pm 0,08 ^x	0,95 \pm 0,09 ^{xy}	1,07 \pm 0,08 ^y
IVSD n	0,44 \pm 0,03	0,41 \pm 0,03	0,48 \pm 0,03

IVSS n	0,70 ± 0,04	0,68 ± 0,05	0,76 ± 0,04
LVIDD n	1,46 ± 0,08 ^{axy}	1,53 ± 0,09 ^{abx}	1,75 ± 0,08 ^{by}
LVIDS n	0,83 ± 0,05	0,82 ± 0,06	0,86 ± 0,05
LVPWD n	0,50 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,51 ± 0,03
LVPWS n	0,70 ± 0,04 ^x	0,75 ± 0,05 ^{xy}	0,82 ± 0,04 ^y
FS	0,40 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,02 ^a	0,50 ± 0,02 ^b
P (seg)	0,035 ± 0,001 ^a	0,038 ± 0,002 ^a	0,046 ± 0,001 ^b
P (mV)	0,23 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,02
QRS (seg)	0,052 ± 0,002 ^a	0,053 ± 0,002 ^a	0,060 ± 0,001 ^b
QRS (mV)	1,49 ± 0,13 ^x	1,81 ± 0,15 ^{xy}	1,82 ± 0,13 ^y

a vs b vs c $p < 0,05$; x vs y $p < 0,1$. VHS, vertebral heart score; VLAS, vertebral left atrium score; LA, atrio izquierdo; Ao, aorta; LA/Ao, ratio atrio izquierdo/aorta; IVSD, septum en diástole; IVSS, septum en sístole; LVIDD, diámetro del ventrículo izquierdo al final de la diástole; LVIDS, diámetro del ventrículo izquierdo al final de la sístole; LVPWD, pared libre del ventrículo izquierdo en diástole; LVPWS, pared libre del ventrículo izquierdo en sístole; (estas mismas abreviaturas con la n significa que las medidas están normalizados para el PV). FS, fracción de acortamiento; P, onda P; QRS, complejo QRS.

11.III) Variables bioquímicas

La concentración de urea se vio afectada por el estado de salud de los animales ($p = 0,0066$). La misma fue mayor (aproximadamente el doble) en el grupo clínico (C), que en el sano y el B, no existiendo diferencia entre los dos últimos grupos (Tabla 6).

La creatinina sanguínea, presentó diferencias según el estado de salud de los animales ($p = 0,038$). En el grupo C fue mayor que en el sano, y el grupo B tendió a presentar mayores concentraciones que los animales sanos ($p = 0,07$). No se encontraron diferencias entre el grupo C y B (Tabla 6).

Las concentraciones de sodio (Na) y cloro (Cl) no se afectaron por el grupo al que pertenecía el animal. En cambio, la concentración de potasio (K) sí arrojó diferencias según el estado de salud del animal ($p = 0,02$), siendo mayor en el

grupo B que en el sano, y con tendencia a disminuir en el grupo C al compararlo con el B ($p=0,08$) (Tabla 6)

En el funcional hepático no se evidenciaron efectos por grupo en la determinación de albúmina, globulina, proteínas totales, GOT, GPT, FAS, colesterol, ni bilirrubina. Sin embargo la GOT presentó una tendencia a ser mayor en el grupo C que en el B ($p=0,05$) (Tabla 6).

Tabla 6: Concentraciones (Promedio \pm Error Estándar) de las variables bioquímicas estudiadas.

	Sanos	Estadío preclínico (B)	Estadío clínico (C)
Urea (mg/dl)	34,0 \pm 11,2 ^a	40,6 \pm 13,2 ^a	84,5 \pm 11,2 ^b
Creatinina (mg/dl)	0,74 \pm 0,09 ^{ax}	0,81 \pm 0,10 ^{aby}	1,08 \pm 0,09 ^b
Sodio (mEq/l)	142,9 \pm 1,0	143,0 \pm 1,1	143 \pm 1,0
Cloro(mEq/l)	109,3 \pm 1,2	110,3 \pm 1,4	109,5 \pm 1,6
Potasio(mEq/l)	4,2 \pm 0,1 ^a	4,7 \pm 0,1 ^{bx}	4,4 \pm 0,1 ^{aby}
Albúmina (g/dl)	3,5 \pm 0,05	3,4 \pm 0,06	3,5 \pm 0,05
Globulinas (g/l)	2,7 \pm 0,1	3,1 \pm 0,2	2,9 \pm 0,1
PT (g/dl)	6,2 \pm 0,1	6,5 \pm 0,2	6,4 \pm 0,1
GOT (UI/l)	33,9 \pm 5,7 ^{xy}	24,2 \pm 6,8 ^x	42,7 \pm 5,7 ^y
GPT (UI/l)	58,4 \pm 10,4	59,9 \pm 12,3	78,2 \pm 10,4
FAS(UI/l)	118,8 \pm 88,3	287,7 \pm 104,5	239 \pm 88,3
Colesterol (mg/dl)	209,4 \pm 12,5	195 \pm 14,8	187,6 \pm 15,0
Bilirrubina total (mg/dl)	0,1 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02

a vs b $p < 0,05$; x vs y $p < 0,1$. PT, proteínas totales; GOT, aspartato aminotransferasa; GPT, alanina amitrotransferasa; FAS, fosfatasa alcalina sérica.

11.IV) Hemograma

No se evidenciaron efectos por grupo en los recuentos celulares (eritrocitos, leucocitos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos), concentración de hemoglobina, ni hematocrito. Los índices hematimétricos incluidos no presentaron diferencias por grupo. El RDW presentó una tendencia a ser mayor en el grupo B que en el C ($p=0,06$), las otras comparaciones entre grupos no se afectaron. El recuento de basófilos fue 0 en todos los casos, por lo que no se incluyó en el estudio (Tabla 7).

Tabla 7: Recuento celular, índices y concentraciones (Promedio \pm Error Estándar) de los parámetros del hemograma.

Hemograma	Sanos	Estadio preclínico (B)	Estadio clínico (C)
Eritrocitos (mil/ μ l)	7.8 \pm 0.3	7.5 \pm 0.4	7.7 \pm 0.3
Hemoglobina (g/dl)	18,1 \pm 0,7	17,2 \pm 0,8	17,6 \pm 0,7
Hematocrito (%)	43,9 \pm 2,0	43,8 \pm 2,4	44,8 \pm 2,1
MCV (fl)	58,9 \pm 0,8	58,7 \pm 1,0	58,7 \pm 0,9
MHC (pg)	23,2 \pm 0,4	23,1 \pm 0,5	23,0 \pm 0,4
MHCH (g/dl)	39,4 \pm 0,5	39,3 \pm 0,6	39,2 \pm 0,5
RDW-CV (%)	16,3 \pm 0,3 ^{xy}	16,9 \pm 0,4 ^x	15,9 \pm 0,3 ^y
Leucocitos (/mm ³)	11.471 \pm 786	9.910 \pm 930	10.177 \pm 816
Linfocitos (/mm ³)	2413,3 \pm 291,8	2104,9 \pm 345,2	2024 \pm 302,8
Neutrófilos (/mm ³)	7650,8 \pm 626,8	6879,9 \pm 741,6	6821 \pm 650,4
Monocitos (/μl)	419,6 \pm 90,1	266,10 \pm 106,4	398,2 \pm 93,3
Eosinofilos (/μl)	655,4 \pm 103,0	551,7 \pm 121,8	552,5 \pm 106,8

x vs y $p < 0,1$

11.V) Hemostasia

El tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de protrombina parcial activado (APTT) no demostraron diferencias entre los distintos grupos testeados. Sin embargo, la concentración de fibrinógeno fue mayor ($p=0.03$), en los enfermos clínicos al compararlos con los sanos. No se encontraron diferencias entre grupos acerca del recuento de plaquetas (Tabla 8).

Tabla 8: Tiempo, concentración y recuento (Promedio \pm Error Estándar) de las variables de coagulación estudiadas.

Crisis sanguínea	Sanos	Estadío preclínico (B)	Estadío clínico (C)
TP (seg)	6,1 \pm 0,1	6,2 \pm 0,1	6,1 \pm 0,1
APTT (seg)	14,3 \pm 0,4	14,1 \pm 0,5	13,8 \pm 0,4
Fibrinógeno (mg/dl)	217,4 \pm 7,9 ^a	280,1 \pm 32,6 ^{ab}	322,5 \pm 27,5 ^b
Plaquetas	394.714 \pm 55.554	522.900 \pm 65.733	544.286 \pm 50.054

a vs b $p \leq 0,05$. TP, tiempo de protrombina; APTT, tiempo de tromboplastina parcial activado.

11.VI) Orina

La densidad urinaria se modificó según el grupo al que pertenecían los animales ($p=0,002$). El grupo sano tuvo una mayor densidad de orina que el B y el C, sin embargo no hubo diferencias entre el grupo preclínico y el clínico. Los otros parámetros estudiados en la orina (pH y proteinuria) no se afectaron por grupo (Tabla 9).

Tabla 9: Valores (Promedio± Error Estándar) de los parámetros evaluados en la orina.

Orina	Sanos	Estadío preclínico (B)	Estadío clínico (C)
Proteínas (g/l)	0.14 ± 0.03	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.03
pH	6.04 ± 0.24	6.00 ± 0.29	5.80 ± 0.24
Densidad	1047,3 ± 3.7 ^a	1035.6 ± 4.4 ^b	1027.4 ± 3.7 ^b

a vs b p<0,05

11.VII) Proteína C reactiva

Los valores de proteína C reactiva presentaron diferencias significativas por grupo (p=0,0007). El grupo C fue mayor que el sano y que el B, sin embargo no se registraron diferencias entre el sano y el B (Tabla 10).

Tabla 10: Valores (Promedio± Error Estándar) de la proteína C reactiva.

	Sanos	Estadío preclínico (B)	Estadío clínico (C)
PCR (µg/ml)	1,38 ± 0,72 ^a	2,29 ± 0,85 ^a	5,54 ± 0,72 ^b

a vs b p<0,05

12. DISCUSION

Las razas que integraron los grupos de animales enfermos fueron caniche, dachshound, yorkshire terrier y shih-tzu, lo cual coincide con lo establecido por diversos autores con respecto a que la EDVM se caracteriza por presentarse en caninos de pequeño porte y a que existen razas predispuestas a padecerla (Borgarelli y Buchanan, 2012; Han et al., 2013; Meurs et al., 2019). También los perros mestizos estuvieron representados, pero siempre de tamaño pequeño y mediano, acorde a la prevalencia de la enfermedad, aunque también ha sido reportada en razas grandes (Borgarelli et al., 2004; O`Leary y Wilkie, 2009). En cuanto a la edad de presentación, los gerontes son los más afectados, ya que la progresión de la enfermedad aumenta con la edad. Según Buchanan (1977) la prevalencia de lesiones valvulares en animales de raza pequeña mayores a 13 años supera el 85 %. En ese sentido, Jones y Zook (1965) reportaron que la prevalencia varió de 5% en caninos menores a un año al 75% en caninos de 16 años. En el presente estudio ambos grupos de perros con EDVM presentaron mayor edad que el grupo sano, siendo los pertenecientes al grupo C los más añosos. Esto respondería a que esta enfermedad posee una fase preclínica extensa y puede tardar años en desarrollar los síntomas de falla cardíaca congestiva (Borgarelli y Haggstrom, 2010; Borgarelli et al., 2012), o inclusive nunca llegar a presentarlos (Atkins et al., 2019). Además, resulta difícil hallar caninos gerontes sanos, porque a medida que los animales envejecen están predispuestos a presentar patologías de distinta índole, por este motivo el grupo sano fue más joven. En este estudio se contó con igual número de machos y hembras en ambos grupos de animales enfermos, este hecho no fue al azar, sino que se seleccionó para que fuera más representativo. En la literatura se indica que los machos se afectan más frecuentemente (Borgarelli y Buchanan, 2012). La frecuencia cardíaca varió entre los grupos, registrando un aumento en el estadio B que se acentúa durante la etapa clínica, al compararlo con los caninos sanos. Este aumento, que concuerda con lo descrito previamente (Haggstrom et al., 1996; Serres et al., 2009; Rasmussen et al., 2012; Petit et al., 2013), puede deberse al incremento del tono simpático y a la activación neurohormonal, que manifiesta la progresión de la enfermedad. El reflejo de Bainbridge tiene la capacidad de aumentar la frecuencia cardíaca entre un 40 a un 60% y responde al estiramiento de los atrios, activando el sistema nervioso simpático (Hall, 2016). Esto podría explicar el incremento de la frecuencia cardíaca en el estadio preclínico de la enfermedad (B), cuya clasificación está determinada precisamente cuando se registra un agrandamiento del AI. La presión arterial sistólica, diastólica y media no fueron diferentes según el estado de salud de los animales, aunque los valores obtenidos son considerados de riesgo moderado para causar daño a los órganos blanco, según el último consenso ACVIM para la presión arterial

(Acierno et al., 2018). Marino et al., 2011 describieron un aumento en la presión arterial debido al estrés generado por el ambiente hospitalario, el llamado “efecto de la túnica blanca”. Por lo tanto, a pesar de procurar cumplir con las recomendaciones establecidas por la ACVIM (Acierno et al., 2018) al momento de la medición, el estrés puede haber sido responsable de los altos valores obtenidos, ya que los animales no estaban familiarizados con esta maniobra. Se utilizaron los miembros anteriores para colocar los manguitos, los cuales según Bodey et al., (1996) son el lugar donde mejor se correlaciona la medida al comparar un método oscilométrico con el método directo, que es el considerado “gold standard”. Así mismo, se obtuvieron valores similares a Rattetz et al. (2010) quienes utilizaron el mismo dispositivo oscilométrico que en el presente trabajo, en caninos sanos. Si bien para el consenso ACVIM (Acierno et al., 2018) no existe ningún método indirecto de medida de presión arterial validado en veterinaria, Vachon et al. (2014), encontraron que el dispositivo oscilométrico utilizado en este estudio fue mejor predictor que el método doppler de la medición directa de la presión arterial, en perros sanos conscientes y anestesiados. Cabe destacar que existió una tendencia a disminuir el valor de la presión sistólica en los caninos del grupo C. Otros autores que evaluaron caninos con EDVM en distintos estadios también registraron una disminución en los que pertenecían al grupo con falla cardíaca (Borgarelli et al., 2008; Ljungvall et al., 2011; Petit et al., 2013). Esta baja en la presión arterial sistólica puede explicarse en parte porque todos recibían un IECA (enalapril o benacepril) junto con pimobendan, como parte de su tratamiento. Ambos tipos de drogas poseen efectos vasodilatadores (Sisson, 1995; Pagel et al., 1996). La diferencia de edad entre los animales de los grupos con EDVM y los sanos no debería afectar el resultado, ya que Meurs et al. (2000) determinaron que no existió variación de la presión arterial sistólica entre caninos sanos gerontes y de edad media (menores aún que la media del grupo control utilizado en este estudio). También la presión arterial media tendió a ser mayor en el grupo B que en los otros grupos, y el grupo sano que el C. La presión arterial media es la mejor estimada por los métodos oscilométricos al ser comparados con la presión invasiva (Garófalo et al., 2012;) ya que es la que el aparato evalúa directamente, y a partir de la misma se estima la presión sistólica y diastólica mediante algoritmos propios del equipo (Ramsey, 1979). No se encontró información acerca de la presión arterial media en caninos con EDVM en la literatura consultada.

La realización de la escala VHS (vertebral heart score) en la radiografía de tórax para establecer el tamaño del corazón determinó un agrandamiento de la silueta cardíaca en los animales en estadio C. El límite superior para considerar un corazón de tamaño normal es 10,5 cuerpos vertebrales, según lo descrito por los creadores del método (Buchanan y Bucheler, 1995). Según los resultados del presente estudio, el promedio de la medida de los caninos sanos coincide con lo descrito por los citados autores. En los últimos años, se han

realizado estudios para ajustar la escala VHS por razas, para que el método sea más certero. En el caso de las razas involucradas en este estudio existen publicaciones efectuadas en yorkshire terrier (Jepsen-Grant et al., 2013), dachshound (Birks et al., 2017), caniche (Pinto et al., 2004) y shih-tzu (Choisunirachon et al.2008). Estos datos coinciden con lo encontrado en el presente trabajo, aunque no fue tabulado porque el número de caninos de cada raza no es lo suficientemente representativo para considerarlo. La identificación de los caninos con EDVM en estadio preclínico (B) basándose únicamente en una radiografía a través de la escala VHS puede ser desafiante, y en este trabajo no hubo una diferencia significativa con el grupo sano, si bien el valor promedio del grupo B estaba por encima de lo considerado normal para un perro sano (Buchanan y Bucheler, 1995). Poad et al., (2020) determinaron dos valores de corte para predecir si hay o no agrandamiento de AI en caninos con EDVM subclínicos. Según sus resultados los caninos con valores de VHS $\leq 10,8$ no tendrían agrandamiento de AI. Por otra parte, los caninos con valores de VHS $\geq 11,7$ presentarían agrandamiento de AI. En el presente estudio, los caninos en estadio preclínico B presentaron un valor promedio similar al establecido como límite inferior, mientras que su valor de corte superior fue mayor a nuestros datos, inclusive fue mayor al valor de los caninos en estadio clínico. Por lo tanto, no coincide con los datos obtenidos, aunque los propios autores concluyeron que no se correlaciona correctamente el agrandamiento de AI detectado por ecografía con la escala VHS (Poad et al., 2020). Es importante tener en cuenta que si bien no se necesita una alta capacitación para efectuar la escala VHS, la selección de los puntos de referencia y la transformación de las dimensiones en unidades vertebrales sí pueden variar según el operador (Hansson et al., 2005). Gordon et al. (2017) sugirieron que si se demuestra un agrandamiento cardíaco (VHS $\geq 0,5$) en un corto periodo de tiempo (6 meses) se puede considerar que el canino con EDVM evaluado pertenece al estadio B. La escala VLAS fue desarrollada por Malcom et al. (2018) e indica que un canino puede considerarse en estadio B si el tamaño del AI medido en la radiografía de tórax es mayor a 2,3 cuerpos vertebrales. Esto coincide con lo encontrado en el presente trabajo, y además cabe destacar que este índice fue capaz de discriminar entre los tres grupos estudiados. En ese sentido, Mikawa et al. (2020) determinaron que el índice VLAS es útil para conocer cuando un canino con EDVM pasa al estadio B2, aunque propusieron un valor de corte más alto ($\geq 2,5$ cuerpos vertebrales) que el original. Contrariamente, Poad et al. (2020) encontraron una baja correlación entre la medida del AI efectuada por VLAS y por ecocardiografía en caninos con EDVM en estadio B2. Por la mayor exactitud para realizar mediciones, el estudio ecocardiográfico es el método de elección para determinar si existe remodelación cardíaca en el paciente con EDVM, y por lo tanto es el utilizado para discriminar en que estadio de la enfermedad se encuentra un canino asintomático (Borgarelli y Haggstrom, 2010; Keene et al., 2019). El método ecocardiográfico descrito por Hansson et al. (2002) para realizar la medida del

AI es el más utilizado. El mismo se obtiene en un corte transversal de base cardíaca, en modo B. Recientemente Strohm et al. (2018) desarrollaron otro método para realizar las medidas cardíacas, tanto atriales como ventriculares, en eje longitudinal en modo B. Sin embargo debido a que es un método novedoso que no ha sido muy utilizado aún, no fue realizado en este trabajo. El índice LA/Ao es la relación más utilizada para establecer la existencia de agrandamiento de AI, el cual es certero si es $\geq 1,6$ (Gordon et al., 2017; Keene et al., 2019). El valor de este índice permitió discriminar a los animales incluidos en este estudio por grupo. Sin embargo, si observamos el diámetro del AI en milímetros hay una tendencia a ser mayor en el grupo B pero no existe diferencia entre el grupo sano y el C. Esto puede explicarse porque el promedio del peso vivo de los animales del grupo sano fue mayor que el del grupo C, provocando que se asemeje la medida del AI, a pesar de la presencia de la enfermedad. Si nos referimos a las tablas de rangos de referencia de valores ecocardiográficos por peso vivo, la medida del AI para un canino de 10kg de peso (promedio del grupo sano) es entre 16,3 a 18,3mm, mientras que para un canino de 6kg de peso (promedio del grupo C) es de 13,7 a 16,3 (Goncalves et al., 2002). Por este motivo se utilizó la escala alométrica propuesta por Cornell et al. (2004) que se basa en un cálculo logarítmico que permite comparar medidas de diferentes animales sin importar su peso vivo. Al utilizar este método se observó que la medida del AI fue en ascenso hasta el estadio C, como es lo esperado. Este mismo cálculo fue realizado para todos los parámetros del ventrículo izquierdo medidos en modo M. El diámetro del ventrículo izquierdo en diástole fue incrementando su tamaño junto al progreso de la enfermedad. Esto se explica porque el ventrículo izquierdo aumenta su tamaño al recibir un exceso de sangre en cada diástole, que proviene del AI, generado por el reflujo de la válvula mitral (Chetboul y Tissier, 2012). La sobrecarga de volumen dada por el reflujo de la válvula mitral, causa un aumento en la replicación de los sarcomeros en serie, determinando un aumento en la longitud de los miocitos. Esto provoca una hipertrofia excéntrica. Este efecto compensaría el estrés que sufre la pared ventricular durante la diástole. Sin embargo, la sobrecarga de volumen sumado a una disminución de la poscarga, como ocurre en la EDVM, no va a provocar una hipertrofia adecuada, ya que una poscarga elevada es el principal estímulo para el desarrollo de la misma. Por lo que el desenlace será una disfunción sistólica, como se ha demostrado en modelos caninos experimentales (Carabello et al., 1989). En el presente estudio se registró un leve incremento del grosor de la pared libre ventricular. Contrariamente, Borgarelli et al. (2007) estudiaron la hipertrofia ventricular provocada por la EDVM y concluyeron que el grosor de la pared libre ventricular es similar al compararlos con caninos normales. El bajo espesor de la pared en relación con el aumento del diámetro del ventrículo izquierdo contribuye al fallo sistólico progresivo que sufre el ventrículo izquierdo en la EDVM (Boon, 2011). Uno de los indicadores de la función sistólica es la fracción de acortamiento, la cual se vio aumentada en los grupos de animales

enfermos, sobretodo en el C. La fracción de acortamiento aumentada en la EDVM responde a que la poscarga está disminuida ya que la válvula mitral es otra puerta de salida para la sangre durante la sístole. Esto determina que aún en estadios avanzados de la enfermedad la fracción de acortamiento este aumentada. Por lo que algunos autores indican que cuando este valor se normaliza sugiere una falla sistólica del miocardio (Bonagura y Schober, 2009; Boon, 2011). Del análisis del electrocardiograma obtuvimos que la duración de la onda P fue mayor en el grupo C con respecto al grupo B, así como la duración del complejo QRS y la amplitud del mismo. Esto refleja un agrandamiento de las cámaras cardíacas izquierdas, tanto atrio como ventrículo, detectado en el estadio C. La diferencia encontrada puede explicarse en el hecho de que, si bien el electrocardiograma puede detectar agrandamiento de cámaras cardíacas, es un método que posee baja sensibilidad. Es decir que cuando hay agrandamiento leve de AI, como en los animales en estadio B, no lo detecta. Sin embargo, cuando lo manifiesta es porque realmente existe, lo que lo convierte en un buen predictor de agrandamiento cardíaco (Lombard y Spencer, 1985). No se registraron arritmias en el presente trabajo, lo cual se asemeja con las bajas incidencias descritas en la literatura. López-Álvarez et al. (2014) evaluaron 257 registros electrocardiográficos de caninos con EDVM y detectaron un 19% de actividad ectópica y un 1,6% de fibrilación atrial, sin signos clínicos. Otros autores estiman entre un 2% (Borgarelli et al., 2008) a un 26% (Haggstrom et al., 2008) de presencia de arritmias y en general asintomáticas.

El aumento en la concentración de urea y creatinina en el estadio clínico de la EDVM fue significativo, sin embargo se mantuvo dentro de los límites de referencia aportados por la IRIS (International renal interest society) para caninos. Este organismo internacional toma como límite inferior 1,4 mg/dl de creatinina para considerar un canino azotémico, según su guía publicada en el año 2019. A medida que la enfermedad cardíaca progresa, la funcionalidad renal puede verse afectada por distintos mecanismos, como por ejemplo la caída del gasto cardíaco, la generación de radicales libres, la activación del sistema renina angiotensina aldosterona y del sistema nervioso simpático (Pouchelon et al., 2015). La probabilidad de desarrollar patologías renales incrementa con la edad (Ross y Osborne, 2006; Polzin, 2011), así como también la EDVM. Por lo tanto los animales añosos con EDVM tienen aún más riesgo de desarrollar falla renal. La literatura acerca de la prevalencia de enfermedad renal crónica en caninos con EDVM es variable. Nicolle et al., 2014 reportaron un 50% de caninos azotémicos en su estudio, sin embargo, el límite superior propuesto para la urea fue de 56 mg/dl, muy por debajo del propuesto por la IRIS (2019) para considerar a un canino azotémico (≥ 124 mg/dl). Según Guglielmini et al. (2013) un 24% de los caninos con EDVM fueron azotémicos, similar a lo publicado por Martinelli et al. (2016) con un 25%. En los tres estudios mencionados, los caninos azotémicos estuvieron en su mayoría

ubicados en los estadios C y D de la enfermedad. En el presente trabajo un 17% de los caninos con EDVM presentaron una concentración de creatinina $\geq 1,4$, es decir que son considerados azotémicos. Todos pertenecían al estadio C. Posiblemente la prevalencia de azotemia en este estudio fue menor a lo publicado previamente porque no se incluyeron caninos en estadio D, el más grave de la enfermedad. Este incremento de la prevalencia de la enfermedad renal concomitante con la severidad de la falla cardiaca puede explicarse por 3 mecanismos. El efecto de las drogas utilizadas para el tratamiento de la EDVM, el efecto de la edad y la pre existencia de falla renal crónica, y el efecto de la EDVM directo sobre la función renal (Nicolle et al., 2014). La densidad urinaria fue menor en el estadio C, y se ubicó por debajo al límite considerado indicativo de falla renal (1030) (IRIS, 2019; Hezzel et al., 2020). Las drogas utilizadas habitualmente para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva que pueden afectar la función renal son los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los diuréticos de asa (furosemide) (Pouchelon et al., 2015). Sin embargo, la administración por largos periodos de tiempo de enalapril no demostró aumentar la concentración de urea ni de creatinina en caninos con EDVM (Atkins et al., 2002). Así mismo tampoco se registraron alteraciones con el uso de benacepril, más aun, los niveles de creatinina disminuyeron en un estudio de caninos con EDVM que recibieron benacepril (grupo de estudio BENCH, 2004). La administración de furosemide a altas dosis está asociada con deshidratación y deterioro de la función renal, lo que a su vez podría potenciar la potencial nefrotoxicidad inducida por los IECAs (Pouchelon et al., 2015). En ese sentido, Takusagawa et al., 2007 determinaron que la administración prolongada de furosemide a caninos sanos incrementó la creatininemia y la uremia, y provocó la disminución de la densidad urinaria sobre todo luego de las primeras horas de administración, donde obtuvo valores menores a los considerados de referencia (1020). Sin embargo Harada et al. (2015) no encontraron variaciones de urea ni creatinina sérica en caninos que recibieron furosemide a través de distintas vías de administración. Con respecto al ionograma, la concentración de potasio aumentó levemente en el estadio B para luego disminuir en el C, manteniéndose en el rango de referencia. Lo esperado al activarse el sistema renina angiotensina aldosterona es un incremento en la excreción renal de potasio (Ames et al., 2015). El uso de IECAs y espironolactona, juntos o separados, aumentan la concentración de potasio plasmático al inhibir el SRAA y al disminuir su excreción renal respectivamente, como fue descrito en humanos con azotemia (Berry y McMurray, 2001; Schepkens et al., 2001). En ese sentido, Thomason et al. (2007) no detectaron un incremento en el potasio, excepto en los caninos con falla renal concomitante. Eso podría explicar el leve incremento en la concentración de potasio registrado en el estadio C en este estudio, ya que los caninos con falla renal eran apenas el 17%. Boswood y Murphy (2006) describieron una disminución leve en los estadios más avanzados de la falla cardiaca debido al uso de diuréticos de asa, los cuales aumentan la eliminación

renal de potasio. Sin embargo, los caninos en estadio C que eran tratados con furosemide continuamente eran pocos, debido a que en el protocolo terapéutico el furosemide fue utilizado solamente al encontrar indicios de edemas o derrames. La concentración de sodio y cloro no registró diferencias entre los grupos, coincidiendo con Thomason et al. (2007). Sin embargo Boswood y Murphy (2006) encontraron variaciones en estos iones, siendo menor las concentraciones en los estadios mas graves, asociándolos al uso de diuréticos de asa y a la progresión de la enfermedad. Los valores de función hepática no sufrieron modificaciones, exceptuando un aumento leve de la GOT en el estadio C. La literatura acerca del síndrome cardiohepático en medicina veterinaria es pobre. Lo que refiere a medicina humana existe una clasificación similar al síndrome cardiorenal, donde se establece que es frecuente la disfunción hepática en personas con insuficiencia cardiaca congestiva. Se considera que la GGT es la enzima que se eleva más habitualmente, seguido de la bilirrubina y de la GOT (Poelzl y Auer, 2014). El grupo de estudio BENCH (2004) determinó que un 55% de los caninos con falla cardiaca que formaron parte del estudio presentaban concentraciones elevadas de GOT, con lo cual suponen que la falla hepática concomitante a la EDVM es frecuente. El hígado se ve comprometido porque el aporte sanguíneo esta disminuido, y a la vez, existe congestión hepática. Esta alteración compromete la eliminación de ciertas drogas, ya que disminuyen las enzimas encargadas del metabolismo como la citocromo P-450 (Lambert et al., 1991).

El hemograma no presentó alteraciones, a excepción de la amplitud de la distribución eritrocitaria (RDW-CV). Este parámetro es una medida cuantitativa de anisocitosis y refleja la variabilidad del tamaño de los eritrocitos circulantes. Este índice permite reflejar la presencia de anemia e inclusive diferenciar si es regenerativa o no (Neiger et al., 2002). En medicina humana un aumento en el RDW está asociado a pronostico pobre en pacientes con falla cardiaca crónica (Groenveld et al., 2008), sin embargo no se detectaron cambios en el mismo en caninos con EDVM (Guglielmini et al., 2013). En el presente trabajo, se registró que el 8% de los caninos presentaron anemia, determinado por la concentración de hemoglobina y el valor del hematocrito. El índice RDW disminuyó levemente en el estadio C, lo cual puede asociarse a que la prevalencia de anemia fue muy baja. Los resultados del presente estudio coinciden con los de Boswood y Murphy (2006) y Guglielmini et al. (2013), quienes no encontraron diferencias en los valores del hematocrito, del recuento de eritrocitos, ni de la hemoglobina entre los caninos sanos y con EDVM. Sin embargo, otros autores sí registraron una disminución en estos parámetros (Farabaugh et al., 2004; Yu y Huang, 2016). En cuanto al leucograma también hay estudios contrapuestos, por un lado, y coincidiendo con el presente estudio, algunos autores no establecieron diferencias entre los distintos estadios de caninos con EDVM (Farabaugh et al., 2004; Deepti y Yathiraj, 2015). Por otro lado, Hamilton –Elliot et al. (2018) encontraron valores mayores

en el recuento de leucocitos, neutrófilos y monocitos en el estadio C pero siempre dentro de los valores de referencia. El recuento de plaquetas tampoco evidenció modificaciones. No obstante únicamente un canino correspondiente al grupo C presentó trombocitosis según el límite de referencia del laboratorio al cual se remitieron las muestras. Se han reportado complicaciones asociadas a microtrombos en humanos con enfermedad de la válvula mitral, que pueden provocar desde arritmias hasta microinfartos al ocluir los capilares del músculo cardíaco. Estos están asociados a plaquetas (Walsh et al., 1981). Sin embargo la agregación plaquetaria es menor en los caninos con EDVM (Tanaka y Yamane, 2000). El fibrinógeno fue significativamente mayor en el grupo C, lo cual refleja un incremento en el potencial de coagulación de los caninos con EDVM en estadios avanzados. Esto coincide con Tarnow et al. (2007) y Prihirunkit et al. (2014). Si bien un incremento en el fibrinógeno puede estar presente como consecuencia de deshidratación, en el presente trabajo no se determinó un aumento del hematocrito ni de las proteínas totales. El tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) son las pruebas generalmente utilizadas como escrutinio para evaluar la mayoría de los factores de la coagulación. Los factores involucrados en la vía intrínseca de la coagulación son evaluados por el TTPa mientras que el TP evalúa a la vía extrínseca, ambos coinciden en los factores de la vía común. Ambas pruebas no reportaron modificaciones en los animales con EDVM. Tarnow et al. (2007) y Prihirunkit et al. (2014), que realizaron pruebas más específicas de coagulación (dímero D y antitrombina), y que además obtuvieron resultados similares en los estudios realizados en este trabajo, concluyeron que los caninos con falla cardíaca presentan un estado de hipercoagulación o protrombótico. En medicina humana se piensa que la mayor causa de muerte originada por una falla cardíaca congestiva es la oclusión vascular por trombos y no las arritmias, lo que implica que el estado de hipercoagulabilidad es una condición importante (Narang et al., 1996). Sin embargo la presencia de trombos en caninos es rara, existiendo trabajos (Williams et al., 2016) que indican que es más frecuente la trombosis aórtica que los episodios de tromboembolismo. Si bien los reportes existentes no mencionan la EDVM como la patología de base en los casos de trombosis (Williams et al., 2016), según los autores anteriormente mencionados (Tarnow et al., 2007; Prihirunkit et al., 2014) y los resultados del presente trabajo, tiene el potencial de serlo. Además de estar vinculado a la coagulación, el fibrinógeno es una proteína de fase aguda, es decir que aumenta su liberación frente a estados inflamatorios (Torrente et al., 2015). Se la considera una proteína de fase aguda menor, ya que su concentración incrementa entre 2 a 4 veces respecto a la basal, y permanece elevada en el tiempo (Kjelgaard-Hansen y Jacobsen, 2011). En medicina humana se considera que el nivel del fibrinógeno incrementa notoriamente en pacientes que mueren por falla cardíaca congestiva (Benderly et al., 1996). Además un estudio reciente propone el uso del fibrinógeno como marcador de severidad en humanos con enfermedad obstructiva pulmonar

crónica, ya que incrementa junto con el progreso de la enfermedad (Zhou et al., 2020). La CRP es una proteína de fase aguda mayor, ya que incrementa su concentración entre 100 a 1000 veces en respuesta a la inflamación (Eckersall y Bell, 2010). La CRP fue mayor en los caninos con EDVM en estadio C, sin embargo no permitió discriminar entre los sanos y los EDVM estadio B. La media para el grupo de los caninos sanos coincidió con lo descrito por los autores que validaron el test de ELISA utilizado en este estudio (Kjelgaard-Hansen et al., 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los de Rush et al. (2006) y Reimann et al. (2016), quienes encontraron diferencias entre los animales sanos y con falla cardíaca debida a EDVM. Cunningham et al. (2012) reportaron un aumento de la CRP en caninos con falla cardíaca congestiva debida a EDVM o a cardiopatía dilatada, que se asoció a la severidad de la enfermedad. En el presente estudio los dos caninos que presentaron los valores más altos de CRP (12 µg/ml) correspondieron a los pacientes que se podrían considerar más avanzados en la enfermedad, ya que llevaban un aproximado de 48 meses en el estadio C, superando ampliamente al resto de los caninos del mismo grupo. Ljungvall et al. (2010) no encontraron asociación entre la CRP y la severidad de la enfermedad, aunque similar al presente estudio, obtuvieron valores por encima de los 10 µg/ml en 4 de los 18 caninos que conformaban el estadio C. Nakamura et al. (2008) estudiaron la concentración de CRP en distintas enfermedades en los caninos y determinaron que en la EDVM no existe aumento del valor de la misma, sin embargo los valores de referencia que utilizaron fueron mayores. La EDVM ha sido clásicamente considerada una enfermedad no inflamatoria porque no existe infiltrado de células inflamatorias en las valvas mitrales ni en el miocardio (Buchanan, 1977). Sin embargo estudios posteriores demostraron expresión de citoquinas en el miocardio atrial y ventricular en distintas enfermedades que cursan con falla cardíaca, entre ellas la EDVM (Fonfara et al., 2013). También se demostró un incremento en la expresión de genes relacionados con los procesos inflamatorios en caninos que padecían las fases más avanzadas de la EDVM (Oyama y Chittur, 2006). Se ha descrito la alteración de la función del endotelio vascular en caninos con EDVM (Pedersen et al., 2003; Jones et al., 2012). La misma está bien documentada en seres humanos con falla cardíaca y se asocia con un aumento de la precarga, disminución de la perfusión, reducción de la tolerancia al ejercicio y progresión de la enfermedad (Drexler, 1998; Bauersachs y Widder, 2008). En ese sentido Cunningham et al. (2012) determinaron la presencia de disfunción endotelial microvascular y aumento de la CRP en caninos con falla cardíaca. Además, se ha reportado estrés oxidativo local en el tejido valvular en caninos en las fases finales de EDVM. De esta manera, la asociación entre el estrés oxidativo, la función endotelial y la falla cardíaca congestiva puede ser la responsable del estado inflamatorio, induciendo un incremento en la CRP (Reimann et al., 2016). Cabe destacar que los caninos en edad avanzada pueden tener incrementos en la concentración de CRP porque frecuentemente presentan padecimientos que

generan un leve incremento en la misma, tal como periodontitis u osteoartritis (Hurter et al., 2005; Yu et al., 2010). Sin embargo en el presente estudio las edades entre los grupos B y C fueron iguales pero las concentraciones de CRP fueron significativamente mayores en el grupo C que en el B. En medicina humana está bien documentado el incremento de la misma durante la falla cardiaca, ya que la necrosis tisular es un estímulo importante para su liberación, por lo que se ha convertido en un importante factor de pronóstico en el infarto agudo de miocardio (Hirschfield y Pepys, 2003). Sin embargo en los caninos esta condición no es frecuente. En cambio, los hallazgos histológicos frecuentes en caninos con EDVM crónica son los infartos microscópicos intramurales del miocardio (MIMI) también conocidos como arterioesclerosis miocárdica, y la fibrosis miocárdica (Falk et al., 2006). La arterioesclerosis puede reducir la capacidad vasodilatadora y esto en combinación con el estrés al cual está sometida la pared ventricular izquierda por la sobrecarga de volumen originada en el reflujo que ocasiona la EDVM, genera que la demanda de oxígeno no sea satisfecha. Esto determina la muerte de los miocardiocitos (Falk et al., 2013). Ljungvall et al. (2010) encontraron una asociación entre los valores de troponina cardiaca I y CRP en caninos con EDVM. La TNI se incrementa al registrarse la muerte de los miocardiocitos, ya que es una proteína intracelular, por lo que este hallazgo condice con lo expuesto anteriormente.

13. CONCLUSIONES

- La determinación de parámetros clínicos tales como frecuencia cardiaca y el grado de soplo nos permiten una aproximación práctica a la gravedad de la enfermedad degenerativa de la válvula mitral.
- La realización de la escala VHS y VLAS en la radiografía de tórax permite una acertada estandarización de los caninos que padecen enfermedad degenerativa de la válvula mitral, si bien el método de elección es la ecocardiografía, que admite una detallada evaluación de la remodelación cardiaca.
- Si bien el electrocardiograma detectó el agrandamiento cardiaco no es el estudio más apropiado para esta estimación. Las arritmias son infrecuentes en esta patología.
- La enfermedad degenerativa de la válvula mitral a medida que progresa puede afectar el normal funcionamiento renal, y crear condiciones apropiadas para la formación de trombos.
- La determinación de la proteína C reactiva puede ser útil para formular un pronóstico, ya que incrementa en los estadios avanzados de la enfermedad.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams 3rd, J. E., Bodor, G. S., Davila-Roman, V. G., Delmez, J. A., Apple, F. S., Ladenson, J. H., & Jaffe, A. S. (1993). Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation*, 88(1), 101-106.
2. Acierno, M. J., Brown, S., Coleman, A. E., Jepson, R. E., Papich, M., Stepien, R. L., & Syme, H. M. (2018). ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), 1803-1822.
3. Ames, M. K., Atkins, C. E., & Pitt, B. (2019). The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *Journal of veterinary internal medicine*, 33(2), 363-382.
1. Atkins, C. E., Brown, W. A., Coats, J. R., Crawford, M. A., DeFrancesco, T. C., Edwards, J., ... & Meurs, K. (2002). Effects of long-term administration of enalapril on clinical indicators of renal function in dogs with compensated mitral regurgitation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(5), 654-658.
2. Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Haggstrom, J., ... & Stepien, R. (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(6), 1142-1150.
3. Bader M. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Arch.* 2013;465(1):79-85.
4. Bavegems V, Van Caelenberg A, Duchateau L, Sys SU, Van Bree H, De Rick A. Vertebral heart size ranges specific for whippets. *Vet Radiol Ultrasound* 2005;46:400-403.
5. Beardow, A. W., & Buchanan, J. W. (1993). Chronic mitral valve disease in cavalier King Charles spaniels: 95 cases (1987-1991). *Journal of the American veterinary medical association*, 203(7), 1023-1029.
6. Bauersachs J, Widder JD. (2008) Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmacol Rep* ; 60:119-126.
7. Benderly, M., Graff, E., Reicher-Reiss, H., Behar, S., Brunner, D., & Goldbourt, U. (1996). Fibrinogen is a predictor of mortality in coronary heart disease patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 16(3), 351-356.
8. Berry C, McMurray J. (2001) Life threatening hyperkalemia during combined therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors and spironolactone. *Am J Med* ; 111:587e94.
9. Berro Quiriquino, G. B., & Wijma Cavallo, J. (2017). Estudio retrospectivo de los caninos atendidos en la unidad de cardiología del Hospital de pequeños animales de Facultad de Veterinaria entre 2012 y 2016.

10. Bettoni, M & Zimmermann, M. Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation.*, 105 (2002), pp. 2753-2759.
11. Bigby, S. E., Beths, T., Bauquier, S., & Carter, J. E. (2017). Effect of rate of administration of propofol or alfaxalone on induction dose requirements and occurrence of apnea in dogs. *Veterinary anaesthesia and analgesia*, 44(6), 1267-1275.
12. Birkegård, A. C., Reimann, M. J., Martinussen, T., Häggström, J., Pedersen, H. D., & Olsen, L. H. (2016). Breeding restrictions decrease the prevalence of myxomatous mitral valve disease in cavalier king Charles spaniels over an 8-to 10-year period. *Journal of veterinary internal medicine*, 30(1), 63-68.
13. Birks R, Fine DM, Leach SB, et al. Breed-specific vertebral heart scale for the dachshund. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2017; 53:73-79.
14. Borgarelli, M., Zini, E., D'Agnolo, G., Tarducci, A., Santilli, R. A., Chiavegato, D., ... & Häggström, J. (2004). Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. *Journal of Veterinary Cardiology*, 6(2), 27-34.
15. Borgarelli, M., Tarducci, A., Zanatta, R., & Haggstrom, J. (2007). Decreased systolic function and inadequate hypertrophy in large and small breed dogs with chronic mitral valve insufficiency. *Journal of veterinary internal medicine*, 21(1), 61-67.
16. Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, Santilli RA, Chiavegato D, Poggi M, Bellino C, La Rosa G, Zanatta R, Haggstrom J, Tarducci A. (2008) Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med*; 22:120-128.
17. Borgarelli, M., & Haggstrom, J. (2010). Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: natural history, clinical presentation and therapy. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 40(4), 651-663.
18. Borgarelli, M., Buchanan, J.W., 2012. Historical review, epidemiology and natural history of degenerative mitral valve disease. *J. Vet. Cardiol.* 14, 93–101.
19. Borgarelli, M., Ferasin, L., Lamb, K., Bussadori, C., Chiavegato, D., D'Agnolo, G., ... & Garelli-Paar, C. (2020). DELay of appearance of sYmptoms of canine degenerative mitral valve disease treated with spironolactone and benazepril: The DELAY study. *Journal of Veterinary Cardiology*.
20. Boudoulas H. Etiology of valvular heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003;1:523-532.
21. Bonagura, J. D., & Schober, K. E. (2009). Can ventricular function be assessed by echocardiography in chronic canine mitral valve disease. *Journal of Small Animal Practice*, 50, 12-24.

22. Boon J (2011) *Ecocardiografía veterinaria*. Barcelona, España. Multimédica.
23. Boswood, A., & Murphy, A. (2006). The effect of heart disease, heart failure and diuresis on selected laboratory and electrocardiographic parameters in dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, 8(1), 1-9.
24. Boswood, A., Häggström, J., Gordon, S. G., Wess, G., Stepien, R. L., Oyama, M. A., ... & Smith, S. (2016). Effect of pimobendan in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease and cardiomegaly: the EPIC study—a randomized clinical trial. *Journal of veterinary internal medicine*, 30(6), 1765-1779.
25. Boswood, A., Gordon, S. G., Häggström, J., Wess, G., Stepien, R. L., Oyama, M. A., ... & Smith, S. (2018). Longitudinal analysis of quality of life, clinical, radiographic, echocardiographic, and laboratory variables in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease receiving pimobendan or placebo: the EPIC study. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(1), 72-85.
26. Brown CH, Leverett LB, Lewis CW, et al. Morphological, biochemical, and functional changes in human platelets subjected to shear-stress. *J Lab Clin Med* 1975;86:462–471.
27. Buchanan, W. J. (1977). Chronic mitral valve disease in the dog. *Vet. Med. Small Anm. Clinic*, 60, 75-95.
28. Buchanan JW, Bucheler J. (1995) Vertebral scale system to measure heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc*; 206:194–199.
29. H. Calkins, K.H. Kuck, R. Cappato, et al. HRS/EHRA/ECAS Expert Consensus Statement on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation: Recommendations for Patient Selection, Procedural Techniques, Patient Management and Follow-up, Definitions, Endpoints, and Research Trial Design. *Heart Rhythm.*, 9 (2012), pp. 632-696
30. Carabello BA, Nakano K, Corin W, et al. (1989) Left ventricular function in experimental overload hypertrophy. *Am J Physiol*; 256:974–981.
31. Carson P: Beta blocker therapy in heart failure. *Cardiol Clin* 19:267-278, 2001
32. Chan, I., Wu, S., Chang, C., Chen, W. (2019) Serial measurements of cardiac troponin I in heart failure secondary to canine mitral valve disease *Veterinary Record* 185, 343.
33. Chetboul, V., Tissier, R., Villaret, F., Nicolle, A., Déan, E., Benalloul, T., & Pouchelon, J. L. (2004). Epidemiological, clinical, echo-doppler characteristics of mitral valve endocardiosis in Cavalier King Charles in France: a retrospective
34. Chetboul, V., Serres, F., Tissier, R., Lefebvre, H. P., Sampedrano, C. C., Gouni, V., ... & Pouchelon, J. L. (2009). Association of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration with mitral regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative mitral valve disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(5), 984-994.

35. Chetboul, V., & Tissier, R. (2012). Echocardiographic assessment of canine degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 14(1), 127-148. study of 451 cases (1995 to 2003). *The Canadian veterinary journal= La revue veterinaire canadienne*, 45(12), 1012-1015.
36. Choisunirachon N, Kamonrat P (2008). Vertebral scale system to measure heart size in radiographs of Shih-Tzus. *Thai J Vet Med*; 38(1):60.
37. Cornell, C. C., Kittleson, M. D., Torre, P. D., Häggström, J., Lombard, C. W., Pedersen, H. D., ... & Wey, A. (2004). Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 18(3), 311-321.
38. Coté E y Ettinger SJ (2007) Electrocardiografía y arritmias cardíacas. En: Ettinger SJ y Feldman EC (Eds.) Tratado de medicina interna veterinaria (pp 1040-1076). Madrid, España, Elsevier.
39. Crosara S, Borgarelli M, Perego M, et al. Holter monitoring in 36 dogs with myxomatous mitral valve disease. *Aust Vet J* 2010; 88:386–392.
40. Cruz-Torres L, Griño R, Relos J. (2011) Correlation of total white blood cell and differential count in the development of congestive heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Philipp J Intern Med*; 49:185–90.
41. de Moraes HA y Schwartz DS (2007) Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca. En: Ettinger SJ y Feldman EC (Eds.) Tratado de medicina interna veterinaria (pp 914-940). Madrid, España, Elsevier.
42. Davis, C. J., Gurbel, P. A., Gattis, W. A., Fuzaylov, S. Y., Nair, G. V., O'Connor, C. M., & Serebruany, V. L. (2000). Hemostatic abnormalities in patients with congestive heart failure: diagnostic significance and clinical challenge. *International journal of cardiology*, 75(1), 15-21.
43. Dukes McEwan J (2000) Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca. En: Luis Fuentes V y Swift ST (Eds.) Manual de medicina y cirugía cardiorrespiratoria. Madrid, España, Harcourt.
44. Deepti, B. R., & Yathiraj, S. (2015). Hematological and biochemical variables in congestive heart failure in dogs. *Int J Sci Environ Technol*, 4, 836-40.
45. Drexler H. (1998) Endothelium as a therapeutic target in heart failure. *Circulation* ; 98:2652–2655.
46. Eckersall, P. D., & Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The veterinary journal*, 185(1), 23-27.
47. M. Efremidis, A. Sideris, E. Prappa, et al. Effect of atrial pressure increase on effective refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in patients with lone atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol*, 3 (1999), pp. 307-310

48. Falk T, Jonsson L, Olsen LH, et al. (2010) Associations between cardiac pathology and clinical, echocardiographic and electrocardiographic findings in dogs with chronic congestive heart failure. *Vet J*; 185:68–74.
49. Falk, T., Jönsson, L., Olsen, L. H., & Pedersen, H. D. (2006). Arteriosclerotic changes in the myocardium, lung, and kidney in dogs with chronic congestive heart failure and myxomatous mitral valve disease. *Cardiovascular Pathology*, 15(4), 185–193.
50. Farabaugh, A. E., Freeman, L. M., Rush, J. E., & George, K. L. (2004). Lymphocyte subpopulations and hematologic variables in dogs with congestive heart failure. *Journal of veterinary internal medicine*, 18(4), 505-509.
51. Fenoglio Jr, J. J., Pham, T. D., Wit, A. L., Bassett, A. L., & Wagner, B. M. (1972). Canine mitral complex: ultrastructure and electromechanical properties. *Circulation research*, 31(3), 417-430.
52. Fine DM, Declue AE, Reiner CR. Evaluation of circulating amino terminal pro- B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. *J Am Vet Med Assoc* 2008;232:1674–9
53. Fox, P. R. (2012). Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog. *Journal of veterinary cardiology*, 14(1), 103-126.
54. Garofalo, N. A., Neto, F. J. T., Alvaides, R. K., de Oliveira, F. A., Pignaton, W., & Pinheiro, R. T. (2012). Agreement between direct, oscillometric and Doppler ultrasound blood pressures using three different cuff positions in anesthetized dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 39(4), 324–334.
55. Glasson JR, Komeda MK, Daughters GT, Niczyporuk MA, Bolger AF, Ingels NB, Miller DC. Three-dimensional regional dynamics of the normal mitral annulus during left ventricular ejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111: 574e585.
56. Goncalves AC, Orton EC, Boon JA, et al. (2002). Linear, logarithmic, and polynomial models of M-mode echocardiographic measurements in dogs. *American Journal of Veterinary Research*; 63:994–999.
57. Gordon, S. G., Saunders, A. B., & Wesselowski, S. R. (2017). Asymptomatic canine degenerative valve disease: current and future therapies. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 47(5), 955-975.
58. Groenveld HF, Januzzi JL, Damman K, et al. (2008) Anemia and mortality in heart failure patients. A systematic review and metaanalysis. *J Am Coll Cardiol*; 52:818–827.
59. Hall JE (2016) Guyton y Hall tratado de fisiología médica. Barcelona, España, Elsevier.
60. Hamilton-Elliott, J., Ambrose, E., Christley, R., & Dukes-McEwan, J. (2018). White blood cell differentials in dogs with congestive heart failure (CHF) in comparison to those in dogs without cardiac disease. *Journal of Small Animal Practice*, 59(6), 364-372.

61. Han RI, Black A, Culshaw G, French AT, Corcoran BM. (2010) Structural and cellular changes in canine myxomatous mitral valve disease: an image analysis study. *J Heart Valve Dis*;19:60-70.
62. Han, R. I., Clark, C. H., Black, A., French, A., Culshaw, G. J., Kempson, S. A., & Corcoran, B. M. (2013). Morphological changes to endothelial and interstitial cells and to the extra-cellular matrix in canine myxomatous mitral valve disease (endocardiosis). *The Veterinary Journal*, 197(2), 388-394.
63. Haggstrom J, Kwart C y Pedersen H (2007) Cardiopatías valvulares adquiridas. En: Ettinger SJ y Feldman EC (Eds.) Tratado de medicina interna veterinaria (pp 1022-1039). Madrid, España, Elsevier.
64. Haggstrom J, Kwart C, Hansson K. Heart sounds and murmurs: changes related to severity of chronic valvular disease in the Cavalier King Charles spaniel. *J Vet Intern Med* 1995; 9:75–85.
65. Häggström, J., Hamlin, R. L., Hansson, K., & Kwart, C. (1996). Heart rate variability in relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles spaniels. *Journal of small animal practice*, 37(2), 69-75
66. Haggstrom J, Boswood A, O'Grady M, Jons O, Smith S, Swift S, Borgarelli M, Gavaghan B, Kresken JG, Patteson M, Ablad B, Bussadori CM, Glaus T, Kovacevic A, Rapp M, Santilli RA, Tidholm A, Eriksson A, Belanger MC, Deinert M, Little CJ, Kwart C, French A, Ronn-Landbo M, Wess G, Eggertsdottir AV, O'Sullivan ML, Schneider M, Lombard CW, Duker-McEwan J, Willis R, Louvet A, DiFrancia R. Effect of pimobendan or benazepril hydrochloride on survival times in dogs with congestive heart failure caused by naturally occurring myxomatous mitral valve disease: the QUEST study. *J Vet Intern Med* 2008;22:1124-1135.
67. Hamlin, R. L. (1968). Analysis of the cardiac silhouette in dorsoventral radiographs from dogs with heart disease. *Amer Vet Med Ass J*.
68. Hansson K, Haggstrom J, Kwart C, et al. (2005) Interobserver variability of vertebral heart size measurements in dogs with normal and enlarged hearts. *Vet Radiol Ultrasound*; 46:122–30.
69. Hansson, K., Häggström, J., Kwart, C., & Lord, P. (2002). Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 43(6), 568-575.
70. Hezzell, M. J., Boswood, A., Moonarmart, W., & Elliott, J. (2012). Selected echocardiographic variables change more rapidly in dogs that die from myxomatous mitral valve disease. *Journal of veterinary cardiology*, 14(1), 269-279.
71. Hezzell, M. J., Foster, J. D., Oyama, M. A., Buch, J., Farace, G., Quinn, J. J., & Yerramilli, M. (2020). Measurements of echocardiographic indices and biomarkers of kidney injury in dogs with chronic kidney disease. *The Veterinary Journal*, 255, 105420.

72. Hirschfield, G. M., & Pepys, M. B. (2003). C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *Qjm*, 96(11), 793-807.
73. Hurter, K., Spreng, D., Rytz, U., Schawalder, P., Ott-Knusel, F., Schmokel, H (2005). 411 Measurements of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and 412 synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Veterinary Journal* 169, 281-285.
74. International Renal Interest Society. (2019) Iris Guidelines [http://www.iriskidney.com/pdf/IRIS Staging of CKD modified 2019.pdf](http://www.iriskidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf) Accessed september 20, 2020.
75. Jepsen-Grant, K., Pollard, R. E., & Johnson, L. R. (2013). Vertebral heart scores in eight dog breeds. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 54(1), 3-8.
76. Jones TC, Zook BC (1965). Aging changes in the vascular system of animals. *Ann N Y Acad Sci*; 127(1):671-684.
77. Katz AM: Physiology of the heart, 2nd ed. New York, Raven Press, 1992.
78. Keene, B. W., Atkins, C. E., Bonagura, J. D., Fox, P. R., Häggström, J., Fuentes, V. L., ... & Uechi, M. (2019). ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 33(3), 1127-1140.
79. Kjelgaard-Hansen, M., Kristensen, A. T., & Jensen, A. L. (2003). Evaluation of a Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of C-Reactive Protein in Canine Serum. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(3), 164–168.
80. Kjelgaard-Hansen, M., & Jacobsen, S. (2011). Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. *Clinics in laboratory medicine*, 31(1), 51-70.
81. Kwart, C., Häggström, J. Cardiac auscultation and phonocardiography in dog, horses and cats. Uppsala, Sweden, 2002.
82. Kociol, R. D., Pang, P. S., Gheorghide, M., Fonarow, G. C., O'Connor, C. M., & Felker, G. M. (2010). Troponin elevation in heart failure: prevalence, mechanisms, and clinical implications. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(14), 1071-1078.
83. Kogure K. (1980) Pathology of chronic mitral valvular disease in the dog. *Jpn J Vet Sci*; 42:323-335.
84. Kraetschmer S, Ludwig K, Meneses F, Nolte I, Simon D. Vertebral heart scale in the beagle dog. *J Small Anim Pract* 2008;49:240-243.
85. Lamb CR, Tyler M, Boswood A, Skelly BJ, Cain M. Assessment of the value of the vertebral heart scale in the radiographic diagnosis of cardiac disease in dogs. *Vet Rec* 2000; 146:687-690.
86. Lamb CR, Wikeley H, Boswood A, Pfeiffer DU. Use of breed-specific ranges for the vertebral heart scale as an aid to the radiographic diagnosis of cardiac disease in dogs. *Vet Rec* 2001;148:707–711. 6.

87. Langhorn, R., Tarnow, I., Willesen, J. L., Kjelgaard-Hansen, M., Skovgaard, I. M., & Koch, J. (2014). Cardiac troponin I and T as prognostic markers in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of veterinary internal medicine*, 28(5), 1485-1491.
88. Lenihan DJ et al: Mechanisms, diagnosis, and treatment of diastolic heart failure. *Am Heart J* 130:153-166, 1995.
89. Levick, JR. Cardiovascular responses I pathological situations. En: Introduction to cardiovascular physiology, Butterworths, Londres (1990) cap 15, p.261.
90. Lewis T, Swift S, Wooliams JA, Bloot S. 2010. Heritability of premature mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. *Vet J*. 188:73–76.
91. Ljungvall I, Ahlstrom C, Hoglund K, et al. Use of signal analysis of heart sounds and murmurs to assess severity of mitral valve regurgitation attributable to myxomatous mitral valve disease in dogs. *Am J Vet Res* 2009; 70:604–13.
92. Ljungvall, I., Höglund, K., Tidholm, A., Olsen, L. H., Borgarelli, M., Venge, P., & Häggström, J. (2010). Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 24(1), 153-159.
93. Ljungvall, I., Höglund, K., Carnabuci, C., Tidholm, A. and Häggström, J. (2011), Assessment of Global and Regional Left Ventricular Volume and Shape by Real-Time 3-Dimensional Echocardiography in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25: 1036-1043.
94. Lord, P., Hansson, K., Kvarn, C., & Häggström, J. (2010). Rate of change of heart size before congestive heart failure in dogs with mitral regurgitation. *Journal of Small Animal Practice*, 51(4), 210-218.
95. Malcolm EL, Visser LC, Phillips KL, Johnson LR. Diagnostic value of vertebral left atrial size as determined from thoracic radiographs for assessment of left atrial size in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J Am Vet Med Assoc*. 2018;253(8):1038-1045.
96. Marin LM, Brown J, McBrien C, Baumwart R, Samii VF, Couto CG. Vertebral heart size in retired racing Greyhounds. *Vet Radiol Ultrasound* 2007;48:332–334.
97. Marino, C. L., Cober, R. E., Iazbik, M. C., & Couto, C. G. (2011). White-coat effect on systemic blood pressure in retired racing Greyhounds. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(4), 861-865.
98. Marzolla V, Armani A, Feraco A, et al. Mineralocorticoid receptor in adipocytes and macrophages: a promising target to fight metabolic syndrome. *Steroids*. 2014;91:46-53.
99. McClellan WM, Langston RD, Presley R. Medicare patients with cardiovascular disease have a high prevalence of chronic kidney disease and a high rate of progression to end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1912–1919.

100. Meurs, K., Miller, M., Slater, M., & Glaze, K. (2000). Arterial blood pressure measurement in a population of healthy geriatric dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 36(6), 497–500.
101. Meurs, K. M., Friedenber, S. G., Williams, B., Keene, B. W., Atkins, C. E., Adin, D., ... & Mackay, T. (2018). Evaluation of genes associated with human myxomatous mitral valve disease in dogs with familial myxomatous mitral valve degeneration. *The Veterinary Journal*, 232, 16-19.
102. Meurs, K. M., Adin, D., O'Donnell, K., Keene, B. W., Atkins, C. E., DeFrancesco, T., & Tou, S. (2019). Myxomatous mitral valve disease in the miniature poodle: A retrospective study. *The Veterinary Journal*, 244, 94-97.
103. Mikawa, S., Nagakawa, M., Ogi, H., Akabane, R., Koyama, Y., Sakatani, A., ... & Toda, N. (2020). Use of vertebral left atrial size for staging of dogs with myxomatous valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 30, 92-99.
104. Moonarmart, W., Boswood, A., Fuentes, V. L., Brodbelt, D., Souttar, K., & Elliott, J. (2010). N-terminal pro B-type natriuretic peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *Journal of Small Animal Practice*, 51(2), 84-96.
105. Nakamura, K., Osuga, T., Morishita, K., Suzuki, S., Morita, T., Yokoyama, N., ... & Takiguchi, M. (2014). Prognostic value of left atrial function in dogs with chronic mitral valvular heart disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 28(6), 1746-1752.
106. Nagarajan V, Hernandez AV, Tang WH. Prognostic value of cardiac troponin in chronic stable heart failure: a systematic review. *Heart* 2012;98(24):1778–86.
107. Narang R, Cleland JG, Erhardt L, et al. (1996) Mode of death in chronic heart failure: A request and proposition for more accurate classification. *Eur Heart J*; 17:1390–1403.
108. Neiger R, Hadley J, Pfeiffer DU. (2002) Differentiation of dogs with regenerative and non-regenerative anaemia on the basis of their red cell distribution width and mean corpuscular volume. *Vet Rec*; 150:431–434.
109. Nicolle, A. P., Chetboul, V., Allerheiligen, T., Pouchelon, J. L., Gouni, V., Tessier-Vetzel, D., ... & Lefebvre, H. P. (2007). Azotemia and glomerular filtration rate in dogs with chronic valvular disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 21(5), 943-949.
110. Noszczyk-Nowak, A. (2011). NT-pro-BNP and troponin I as predictors of mortality in dogs with heart failure. *Polish journal of veterinary sciences*, 14(4), 551-556.
111. Olsen, L. H., Fredholm, M., & Pedersen, H. D. (1999). Epidemiology and inheritance of mitral valve prolapse in Dachshunds. *Journal of veterinary internal medicine*, 13(5), 448-456.

112. Olsen LH, Mow T, Koch J, Pedersen HD (1999). Heart rate variability in young clinically healthy Dachshunds: Influence of sex, mitral valve prolapse status, sampling period and time of day. *J Vet Cardiol*; 1:7–15.
113. Olsen LH, Kristensen AT, Haggstrom J, et al. Increased platelet aggregation response in Cavalier King Charles Spaniels with mitral valve prolapse. *J Vet Intern Med* 2001;15:209–216.
114. O'Leary, C. A., & Wilkie, I. (2009). Cardiac valvular and vascular disease in Bull Terriers. *Veterinary pathology*, 46(6), 1149-1155.
115. Opie, L. H. (2002). The neuroendocrinology of congestive heart failure. *Cardiovascular Journal of South Africa*, 13(4), 171-178.
116. Orton, E. C., Lacerda, C. M., & MacLea, H. B. (2012). Signaling pathways in mitral valve degeneration. *Journal of veterinary cardiology*, 14(1), 7-17.
117. Oyama MA, Sisson DD. (2004) Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J Vet Intern Med*; 18:831–839.
118. Oyama, M.A., Chittur, S.V., 2006. Genomic expression patterns of mitral valve tissues from dogs with degenerative mitral valve disease. *American Journal of Veterinary Research* 67,1307-1318.
119. Oyama, M. A., Fox, P. R., Rush, J. E., Rozanski, E. A., & Lesser, M. (2008). Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(10), 1496-1503.
120. Oyama MA, Rush JE, Rozanski EA, et al. Differentiation of congestive heart failure versus respiratory disease in dogs with respiratory signs using NT-proBNP assay. *J Am Vet Med Assoc* 2009;235:1319–25
121. Oyama, M. A. (2009). Neurohormonal activation in canine degenerative mitral valve disease: implications on pathophysiology and treatment. *Journal of Small Animal Practice*, 50, 3-11.
122. Oyama MA, Levy RJ. Insights into serotonin signaling mechanisms associated with canine degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 2010; 24:27-36.
123. Oyama, M. A., & Singletary, G. E. (2010). The use of NT-proBNP assay in the management of canine patients with heart disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 40(4), 545-558
124. Oyama, M. A. (2015). Using Cardiac Biomarkers in Veterinary Practice. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(3), 555–566
125. Oyama, M. A., Elliott, W. C., Loughran, K. A., Kossar, A. P., Castillero, E., Levy, R. J., & Ferrari, G. (2020). Comparative Pathology of Human and Canine Myxomatous Mitral Valve Degeneration: 5HT and TGF- β Mechanisms. *Cardiovascular Pathology*, 107196.

126. Pappone C, Santinelli V, Manguso F, *et al* (2004). Pulmonary vein denervation enhances long-term benefit after circumferential ablation for paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation.*, 109, pp. 327-334.
127. Parker, H. G., & Kilroy-Glynn, P. (2012). Myxomatous mitral valve disease in dogs: does size matter?. *Journal of veterinary cardiology*, 14(1), 19-29.
128. Pedersen, H.D., Haggstrom, J., 2000. Mitral valve prolapse in the dog: a model of mitral valve prolapse in man. *Cardiovasc. Res.* 47, 234–243.
129. Petit, A. M., Gouni, V., Tissier, R., Trehou-Sechi, E., Misbach, C., Pouchelon, J. L., ... & Chetboul, V. (2013). Systolic arterial blood pressure in small-breed dogs with degenerative mitral valve disease: A prospective study of 103 cases (2007–2012). *The Veterinary Journal*, 197(3), 830-835.
130. Petrič, A. D., Lukman, T., Verk, B., & Svete, A. N. (2018). Systemic inflammation in dogs with advanced-stage heart failure. *Acta veterinaria scandinavica*, 60(1), 20.
131. Pinto AB, Fonseca BC, Iwasaki M. (2004). Avaliação radiográfica da silhueta cardíaca pelo método de mensuração VHS (vertebral heart size) em cães da raça Poodle clinicamente normais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 41(4), 261-267.
132. Poad, M. H., Manzi, T. J., Oyama, M. A., & Gelzer, A. R. (2020). Utility of radiographic measurements to predict echocardiographic left heart enlargement in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(5), 1728-1733.
133. Poelzl, G., & Auer, J. (2014). Cardiohepatic Syndrome. *Current Heart Failure Reports*, 12(1), 68–78.
134. Polzin, D. J. (2011) Chronic kidney disease in small animals. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 41, 15-30
135. Polizopoulou, Z. S., Koutinas, C. K., Dasopoulou, A., Patsikas, M., York, M., Roman, I., ... & O'Brien, P. J. (2014). Serial analysis of serum cardiac troponin I changes and correlation with clinical findings in 46 dogs with mitral valve disease. *Veterinary clinical pathology*, 43(2), 218-225.
136. Pomerance A, Whitney JC. Heart valve changes common to man and dog: a comparative study. *Cardiovasc Res* 1970; 4:61-66.
137. Pouchelon, J. L., Atkins, C. E., Bussadori, C., Oyama, M. A., Vaden, S. L., Bonagura, J. D., ... & Grauer, G. F. (2015). Cardiovascular–renal axis disorders in the domestic dog and cat: a veterinary consensus statement. *Journal of Small Animal Practice*, 56(9), 537-552.
138. Potter, L. R., Yoder, A. R., Flora, D. R., Antos, L. K., & Dickey, D. M. (2009). Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic

- functions and therapeutic applications. In *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications* (pp. 341-366). Springer, Berlin, Heidelberg.
139. Prihirunkit, K., Sastravaha, A., Lekcharoensuk, C., & Chanloinapha, P. (2014). Hemostatic markers in congestive heart failure dogs with mitral valve disease. *Journal of veterinary medicine, 2014*.
 140. Ramsey M. Noninvasive automatic determination of mean arterial pressure. *Med Biol Eng Comput* 1979;17(1):11–18.
 141. Rasmussen, C.E., Falk, T., Zois, N.E., Moesgaard, S.G., Haggstrom, J., Pedersen, H.D., Ablad, B., Nilsen, H.Y., Olsen, L.H., 2012. Heart rate, heart rate variability, and arrhythmias in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26, 76–84.
 142. Rattez, E. P., Reynolds, B. S., Concordet, D., Layssol-Lamour, C. J., Segalen, M. M., Chetboul, V., & Lefebvre, H. P. (2010). Within-day and between-day variability of blood pressure measurement in healthy conscious Beagle dogs using a new oscillometric device. *Journal of Veterinary Cardiology, 12*(1), 35-40.
 143. Reimann, M. J., Ljungvall, I., Hillström, A., Møller, J. E., Hagman, R., Falk, T., ... & Olsen, L. H. (2016). Increased serum C-reactive protein concentrations in dogs with congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease. *The Veterinary Journal, 209*, 113-118.
 144. Relford, R., Robertson, J., & Clements, C. (2016). Symmetric dimethylarginine: improving the diagnosis and staging of chronic kidney disease in small animals. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 46*(6), 941-960.
 145. Reynolds CA, Brown DC, Rush JE, Fox PR, Nguyenba TP, Lehmkuhl LB, Gordon SG, Kelliham HB, Stepien RL, Lefbom BK, Meier CK, Oyama MA. Prediction of first onset of congestive heart failure in dogs with degenerative mitral valve disease: the PREDICT cohort study. *J VetCardiol* 2012;14:193-202.
 146. Robinson y Maxie en jubbkennedy
 147. Ross, S. & Osborne, C. (2006) Clinical progression of early chronic renal failure and implications for management. In: *Consultations in Feline Internal Medicine*. Eds J. August. Elsevier, St. Louis, MO, USA. pp 389-402.
 148. Ruaux, C., Scollan, K., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., & Sisson, D. D. (2015). Biologic variability in NT-pro BNP and cardiac troponin-I in healthy dogs and dogs with mitral valve degeneration. *Veterinary clinical pathology, 44*(3), 420-430.
 149. Sabbah HN, Levine TB, Gheorghide M, Kono T, Goldstein S. Hemodynamic response of a canine model of chronic heart failure to intravenous dobutamine, nitroprusside, enalaprilat, and digoxin. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1993;7:349-356.

150. Seelinger E, Wronski T, Ladwig M, et al. The “body fluid pressure control system” relies on the renin-angiotensin-aldosterone system: balance studies in freely moving dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(5–6):394-399.
151. Serfass, P., Chetboul, V., Sampedrano, C. C., Nicolle, A., Benalloul, T., Laforge, H., ... & Tissier, R. (2006). Retrospective study of 942 small-sized dogs: Prevalence of left apical systolic heart murmur and left-sided heart failure, critical effects of breed and sex. *Journal of Veterinary Cardiology*, 8(1), 11-18.
152. Serres F, Chetboul V, Tissier R, Sampedrano CC, Gouni V, Nicolle AP, Pouchelon JL. Chordae tendineae rupture in dogs with degenerative mitral valve disease: prevalence, survival, and prognostic factors (114 cases, 2001-2006). *J Vet Intern Med* 2007; 21:258-264.
153. Serres F, Chetboul V, Tissier R, Poujol L, Gouni V, Carlos Sampedrano C, Pouchelon JL. Comparison of 3 ultrasound methods for quantifying left ventricular systolic function: correlation with disease severity and prognostic value in dogs with mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 2008; 22:566-577.
154. Serres, F., Pouchelon, J. L., Poujol, L., Lefebvre, H. P., Trumel, C., Daste, T., ... & Chetboul, V. (2009). Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *Journal of veterinary cardiology*, 11(2), 103-121.
155. Silverberg D, Wexler D, Sheps D, et al. The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: a randomized controlled study. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1775–1780.
156. Singh JP, Evans JC, Levy D, Larson MG, Freed LA, Fuller DL, Lehman B, Benjamin EJ. Prevalence and clinical determinants of mitral, tricuspid, and aortic regurgitation (the framingham heart study). *Am J Cardiol* 1999; 83:897-902.
157. Sisson, D. D. (1995). Acute and short-term hemodynamic, echocardiography, and clinical effects of enalapril maleate in dogs with naturally acquired heart failure: results of the invasive multicenter PROspective veterinary evaluation of Enalapril study: the IMPROVE study group. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9(4), 234-242.
158. Sharifov, O. F., Fedorov, V. V., Beloshapko, G. G., Glukhov, A. V., Yushmanova, A. V., & Rosenshtraukh, L. V. (2004). Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(3), 483-490.
159. J.L. Smeets, M.A. Allessie, W.J. Lammers, *et al.* The wavelength of the cardiac impulse and reentrant arrhythmias in isolated rabbit atrium.

- The role of heart rate, autonomic transmitters, temperature, and potassium. *Circ Res.*, 58 (1986), pp. 96-108.
160. Spratt DP, Mellanby RJ, Drury N, et al. Cardiac troponin I: Evaluation I of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *J Small Anim Pract* 2005;46:139–145.
 161. Stephens H, Vanholder R, Billouw JM, Lameire N. (2001) Life threatening hyperkalemia during combined therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors and spironolactone: an analysis of 25 cases. *Am J Med* ; 110:438-41.
 162. Strohm, L. E., Visser, L. C., Chapel, E. H., Drost, W. T., & Bonagura, J. D. (2018). Two-dimensional, long-axis echocardiographic ratios for assessment of left atrial and ventricular size in dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, 20(5), 330-342.
 163. Suh, S. I., Lu, T. L., Choi, R., & Hyun, C. (2020). Echocardiographic Features in Canine Myxomatous Mitral Valve Disease: An Animal Model for Human Mitral Valve Prolapse. In *Echocardiography*. IntechOpen.
 164. Swenson L, Haggstrom J, Kwart C, Juneja RK. 1996. Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles Spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring. *J Am Vet Med Assoc.* 208:2009–2012.
 165. Tanaka, R., & Yamane, Y. (2000). Platelet aggregation in dogs with mitral valve regurgitation. *American journal of veterinary research*, 61(10), 1248-1251.
 166. Tanaka R, Murota A, Nagashima Y, Yamane Y. Changes in platelet life span in dogs with mitral valve regurgitation. *J Vet Intern Med* 2002;16:446–451.
 167. Tarnow, I., Kristensen, A. T., Olsen, L. H., & Pedersen, H. D. (2004). Assessment of changes in hemostatic markers in Cavalier King Charles Spaniels with myxomatous mitral valve disease. *American journal of veterinary research*, 65(12), 1644-1652.
 168. Tarnow, I., Falk, T., Tidholm, A., Martinussen, T., Jensen, A. L., Olsen, L. H., ... Kristensen, A. T. (2007). Hemostatic Biomarkers in Dogs with Chronic Congestive Heart Failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(3), 451–457.
 169. Tarnow, I., Olsen, L. H., Kwart, C., Høglund, K., Moesgaard, S. G., Kamstrup, T. S., ... & Häggström, J. (2009). Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *The Veterinary Journal*, 180(2), 195-201.
 170. Tebaldi, M., Lourenço, M. L. G., Machado, L. H. A., Sudano, M. J., & Carvalho, L. R. (2012). Estudo da pressão arterial pelo método indireto oscilométrico (petmap®) em cães domésticos não anestesiados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 1456-1464.

171. Terzo, E., Di Marcello, M., McAllister, H., Glazier, B., Lo Coco, D., Locatelli, C., ... & Brambilla, P. G. (2009). Echocardiographic assessment of 537 dogs with mitral valve prolapse and leaflet involvement. *Veterinary radiology & ultrasound*, 50(4), 416-422.
172. Torrente, C., Manzanilla, E. G., Bosch, L., Fresno, L., Rivera del Alamo, M., Andaluz, A., ... & Ruiz de Gopegui, R. (2015). Plasma iron, C-reactive protein, albumin, and plasma fibrinogen concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 25(5), 611-619.
173. Tsakiris, A. G., Von Bernuth, G. O. E. T. Z., Rastelli, G. C., Bourgeois, M. J., Titus, J. L., & Wood, E. H. (1971). Size and motion of the mitral valve annulus in anesthetized intact dogs. *Journal of applied physiology*, 30(5), 611-618.
174. UECHI, M., SHIMIZU, A., & MIZUNO, M. (2002). Heart rate modulation by sympathetic nerves in dogs with heart failure. *Journal of veterinary medical science*, 64(11), 1023-1029.
175. Vachon, C., Belanger, M. C., & Burns, P. M. (2014). Evaluation of oscillometric and Doppler ultrasonic devices for blood pressure measurements in anesthetized and conscious dogs. *Research in Veterinary Science*, 97(1), 111–117.
176. Yosefy C, Ben Barak A. Floppy mitral valve/mitral valve prolapse and genetics. *J Heart Valve Dis* 2007; 16:590-595.
177. Yoshikawa T et al: Neurohumoral activations in congestive heart failure: correlations with cardiac function, heart rate variability, and baroreceptor sensitivity. *Am Heart J* 137:666-671, 1999.
178. Yu, I. B. Y., & Huang, H. P. (2016). Prevalence and prognosis of anemia in dogs with degenerative mitral valve disease. *BioMed research international*, 2016.
179. Yu, G., Yu, Y., Li, Y.N., Shu, R., 2010. Effect of periodontitis on susceptibility to atrial 486 fibrillation in an animal model. *Journal of Electrocardiology* 43, 359-366.
180. Walsh PN, Kansu TA, Corbett JJ, et al. Platelets, thromboembolism and mitral valve prolapse. *Circulation* 1981;63:552–559.
181. Ware, W. A., Lund, D. D., Subieta, A. R., & Schmid, P. G. (1990). Sympathetic activation in dogs with congestive heart failure caused by chronic mitral valve disease and dilated cardiomyopathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197(11), 1475-1481.
182. Whitney JC. Cardiovascular pathology. *J Small Anim Pract* 1967; 8:459-465.
183. Winter, R. L., Saunders, A. B., Gordon, S. G., Buch, J. S., & Miller, M. W. (2017). Biologic variability of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in healthy dogs and dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of veterinary cardiology*, 19(2), 124-131.

184. Wolf, J., Gerlach, N., Weber, K., Klima, A., & Wess, G. (2012). Lowered N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in response to treatment predict survival in dogs with symptomatic mitral valve disease. *Journal of veterinary cardiology*, *14*(3), 399-408.
185. Woodfield, J. A. (1995). Controlled clinical evaluation of enalapril in dogs with heart failure: results of the cooperative veterinary enalapril study group the cove study group. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *9*(4), 243-252.
186. Zhou, B., Liu, S., He, D., Wang, K., Wang, Y., Yang, T., Zhang, Q., Zhang, Z., & Niu, W. (2020). Fibrinogen is a promising biomarker for chronic obstructive pulmonary disease: evidence from a meta-analysis. *Bioscience reports*, *40*(7), BSR20193542.