

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INDICADORES ECODOPPLERCARDIOGRÁFICOS DE FUNÇÃO CARDÍACA EM
CÃES COM DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VALVA MITRAL E SUAS
CORRELAÇÕES COM VALORES SÉRICOS DAS INTERLEUCINAS 1 β E 4**

**Pós-graduando: Rafael Rodrigues Camacho
Orientador: Prof. Dr. Marlos Gonçalves Sousa**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (área de concentração em Clínica Médica Veterinária).

**Jaboticabal – SP – Brasil
Fevereiro, 2013**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL RODRIGUES CAMACHO – filho de Aparecido Antonio Camacho e Fátima Cristina Rodrigues Camacho, nascido em 4 de julho de 1987 na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo. Em Dezembro de 2010, tornou-se Médico Veterinário pelo Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), em São José do Rio Preto, SP. Em Março de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* de Jaboticabal, tendo, desde então, participado das atividades do Serviço de Cardiologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel.

***Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no
Uso de Animais da FCAV-UNESP (/2013).***

“Faça o que pode, com o que tem, onde estiver”

Roosevelt

A todos que contribuíram para a execução deste trabalho, e que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse chegar até o fim desta jornada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu pai e minha mãe pelo apoio, conselhos e puxões de orelha.

Agradeço ao Marlos por acreditar em mim, me ajudar nas horas difíceis e me apoiar em todas as partes do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus companheiros de setor pela ajuda incondicional, de todos os dias, e pela presença importante nessa hora da minha vida.

Agradeço ao Fábio (Ferruge), parceiro de atendimento e tutor de toda quarta-feira, pelas explicações e discussões que tanto contribuíram para meu aprendizado.

Agradeço aos meus parceiros nos treinos diários por proporcionarem grandes momentos, grandes competições e uma amizade leal e verdadeira.

Agradeço ao meu treinador (de *Triathlon*) Ricardo Dantas de Lucas, por me ajudar no esporte que tanto amo, e seguir evoluindo no mesmo e na vida.

Agradeço também ao pessoal do IMC de São José do Rio Preto, principalmente na pessoa do Dr. Adalberto Lorga Filho e sua equipe, pela ajuda nos estudos.

Agradeço à minha namorada Natalia por toda dedicação a mim nesse tempo em que estamos juntos.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3. OBJETIVOS.....	22
4. JUSTIFICATIVAS.....	23
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1. Laboratórios.....	24
5.2. Grupos experimentais.....	24
5.3. Métodos.....	25
5.3.1. Avaliação ecodopplercardiográfica.....	25
5.3.2. Dosagem das citocinas.....	26
5.4. Análise estatística.....	27
6. RESULTADOS.....	28
7. DISCUSSÃO.....	40
8. CONCLUSÕES.....	44
9. REFERÊNCIAS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

A'	Velocidade miocárdica máxima no início da sístole atrial
AE	Átrio esquerdo
AE/Ao	Relação átrio esquerdo aorta
AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
Ao	Artéria Aorta
DIVD	Diâmetro interno do ventrículo direito
DIVE _d	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole
DIVE _s	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole
DMVM	Degeneração mixomatosa da valva mitral
E'	Velocidade miocárdica máxima no início da diástole ventricular
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecodopplercardiograma
ESIVE _d	Espessura do septo interventricular em diástole
ESIVE _s	Espessura do septo interventricular em sístole
FEC _%	Fração de encurtamento
FEJ _%	Fração de ejeção
FR	Frequência respiratória
FVI _{Ao}	Fluxo integral das velocidades aórticas
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
ISACHC	<i>International Small Animal Cardiac Health Council</i>
PLVE _%	Espessamento fracional da parede livre do VE
PLVE _d	Parede livre do ventrículo esquerdo em diástole
PLVE _s	Parede livre do ventrículo esquerdo em sístole
S	Velocidade miocárdica máxima na sístole ventricular
SIV _%	Espessamento fracional do septo interventricular

TEVE	Tempo de ejeção ventricular esquerda
$V_{\max}A$	Velocidade máxima da onda A do fluxo mitral
$V_{\max}E$	Velocidade máxima da onda E do fluxo mitral
$V_{\max}Ao$	Velocidade máxima do fluxo aórtico
$V_{\max}Pulm$	Velocidade máxima do fluxo pulmonar

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância das variáveis ecocardiográficas dos cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	28
Tabela 2. Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância dos parâmetros calculados a partir de variáveis ecocardiográficas obtidas em modo-B e modo-M em com cães DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	30
Tabela 3. Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância das variáveis ecocardiográficas doppler dos cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	31
Tabela 4. Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância das variáveis obtidas por doppler tecidual nos cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	33
Tabela 5. Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância das variáveis obtidas por doppler tecidual dos cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	34
Tabela 6. Medianas, percentis (25/75) e resultados da análise de variância das concentrações séricas das interleucinas 1 e 4 em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	36
Tabela 7. Coeficientes de correlação entre as concentrações séricas das interleucinas 1 β e 4 e as variáveis ecocardiográficas (modo B e modo M) obtidas em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	37
Tabela 8. Coeficientes de correlação entre as concentrações séricas das interleucinas 1 β e 4 e as variáveis ecocardiográficas doppler obtidas em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Curvas de calibração da leitora ELISA para determinação das concentrações séricas das interleucinas 1 β (esquerda) e 4 (direita). Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	27
Figura 2. Representação gráfica das médias dos parâmetros ecocardiográficos obtidos em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	29
Figura 3. Representação gráfica das médias da relação AE/Ao obtido em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	30
Figura 4. Representação gráfica das médias dos parâmetros ecocardiográficos doppler obtidos em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	32
Figura 5. Representação gráfica das médias dos parâmetros obtidos por doppler tecidual em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	34
Figura 6. Representação gráfica das médias dos parâmetros calculados a partir de variáveis doppler em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	35
Figura 7. Representação gráfica das medianas, percentis (25/75), valores mínimos e máximos das concentrações séricas das interleucinas 1 e 4 em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	36
Figura 8. Representação gráfica da correlação significativa entre concentração sérica das interleucina 1 β e as frações de encurtamento e ejeção obtidas em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).....	39
Figura 9. Representação gráfica da correlação significativa entre concentração sérica das interleucinas 1 β e 4 e a velocidade máxima da onda A do	39

fluxo mitral obtida em cães acometidos por DMVM. Unesp,
Jaboticabal, SP (2013).....

INDICADORES ECODOPPLERCARDIOGRÁFICOS DE FUNÇÃO CARDÍACA EM CÃES COM DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VALVA MITRAL E SUAS CORRELAÇÕES COM VALORES SÉRICOS DAS INTERLEUCINAS 1 E 4

RESUMO – A degeneração mixomatosa da válvula mitral (DMVM) é uma cardiopatia progressiva e crônica em cães, caracterizada por um quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Embora os sinais clínicos congestivos sejam importantes, o processo de remodelamento miocárdico que acompanha as cardiopatias pode indicar que o organismo está reagindo contra as imposições da doença. Dessa forma, este estudo foi concebido para avaliar as concentrações séricas das interleucinas (IL) 1 β e 4, correlacionando-as aos indicadores ecodopplercardiográficos de função cardíaca em cães com DMVM, apresentam ICC classes Ib e II. O estudo ecocardiográfico evidenciou alterações morfológicas progressivas à medida que a enfermidade se intensificava, comparativamente aos cães saudáveis empregados como controle. Valendo-se do recurso *doppler* tecidual, constatou-se disfunção diastólica nos animais com DMVM e ICC classe II. A análise das concentrações séricas de IL-1 β identificou valores estatisticamente inferiores nos cães da classe Ib comparativamente aos animais controle. Contudo, os cães da classe II apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle e aos animais da classe Ib. Da mesma forma, a análise dos resultados da concentração sérica de IL-4 não demonstrou quaisquer diferenças significativas entre grupos. Houve correlação positiva entre IL-1 e as frações de encurtamento e ejeção, ao passo que correlação negativa foi constatada entre a velocidade máxima da onda A do fluxo mitral e as concentrações séricas de IL-1 β e IL-4. Foi possível concluir que a ICC decorrente de DMVM desencadeia alterações morfológicas no coração, resultando em disfunção diastólica nos cães classe II. Por outro lado, as concentrações séricas de IL-1 β and IL-4 não permitiram categorizar a severidade da DMVM.

Palavras chave: citocinas, lesão miocárdica, insuficiência cardíaca, endocardiose, disfunção cardíaca.

ECHOCARDIOGRAPHIC INDICATORS OF CARDIAC FUNCION IN DOGS WITH MYXOMATOUS MITRAL VALVE DEGENERATION AND THEIR CORRELATION WITH THE SERUM VALUES OF INTERLEUKINS 1 AND 4

ABSTRACT – Myxomatous mitral valve disease (MMVD) is a progressive and chronic cardiopathy, which is characterized by the development of congestive heart failure (CHF). Although the signs of congestion are paramount, the process of remodeling that accompanies cardiac disease might indicate a reaction of the body against the alterations caused by the malady. Therefore, this study was conceived to evaluate the serum concentrations of interleukins (IL) 1 β and 4, correlating them with the echocardiographic indicators of cardiac function in dogs with MMVD and CHF classes Ib and II. The echocardiographic study disclosed morphological alterations that progressed along the intensification of the disease, as compared with the control healthy dogs. The analysis of tissue doppler imaging documented diastolic dysfunction in dogs with MMVD and class II CHF. The serum concentration of IL-1 β was statistically lower than those of both class Ib CHF and control healthy dogs. Nonetheless, similar results were recorded for dogs of class II CHF group and both controls and class Ib animals. Similarly, no significant difference among groups was attained regarding the serum concentration of IL-4. There was a positive correlation between IL-1 β and both fractional shortening and ejection fraction, whereas a negative correlation was demonstrated between the peak velocity of mitral A wave and the serum concentrations of IL-1 β and IL-4. It was concluded that CHF attributable to MMVD causes cardiac morphological alterations, leading to diastolic dysfunction in class II CHF dogs. Also, the serum concentration of IL-1 β and IL-4 did not allow categorizing the severity of MMVD.

Key-words: cytokines, myocardial lesion, cardiac failure, endocardiosis, cardiac dysfunction.

1. INTRODUÇÃO

A degeneração mixomatosa da valva mitral é a doença cardíaca que mais acomete os cães, levando-os a um quadro de insuficiência cardíaca congestiva. Sua prevalência está estimada entre 75% a 80% das enfermidades cardíacas nesta espécie, afetando principalmente cães adultos em idade avançada. Cães de pequeno porte são os mais acometidos, sendo possível constatar diferentes graus da doença, desde animais assintomáticos até aqueles que já apresentam sinais clínicos importantes, como tosse, cansaço fácil e dispneia.

A ativação dos mecanismos compensatórios, incluindo o sistema renina-angiotensina-aldosterona, está diretamente relacionada ao desenvolvimento dos sinais clínicos da insuficiência cardíaca congestiva e acredita-se que todas as mudanças ocorridas no miocárdio sejam atribuídas a uma série de fatores que, com o passar do tempo, deterioram o quadro clínico dos animais acometidos. O aumento da pré-carga e pós-carga, somado à ação da angiotensina II, tem relação direta com a mudança estrutural do miocárdio, mais conhecida como remodelamento cardíaco.

Diversas teorias foram propostas para o remodelamento e perda da função cardíaca, dentre os quais está a liberação de mediadores inflamatórios produzidos no próprio cardiomiócito, os quais poderiam explicar essas mudanças morfológicas e funcionais do coração ao longo do desenvolvimento da degeneração mixomatosa mitral. As citocinas estão intimamente ligadas a esse processo, porém não se conhecem as reais mudanças por elas desencadeadas, bem como se sua concentração sérica reflete o real cenário da doença, correlacionando-se às alterações cardíacas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A degeneração mixomatosa da valva mitral (DMVM) ou endocardiose valvar mitral é a enfermidade cardíaca de maior prevalência em cães. A incidência da DMVM aumenta com a idade e tem sido relatada com maior frequência em cães machos, de raças de pequeno porte e miniaturas, tais como *Poodle Toy* e miniatura, *Schnauzer* miniatura, *Chihuahua*, *Pinscher*, *Fox Terrier*, *Boston Terrier*, *Cocker Spaniel* inglês e americano, *Whippet* e *Cavalier King Charles Spaniel*. Entretanto, cães de raças de grande porte, como Pastor Alemão, também podem ser acometidos (BUCHANAN, 1977; THRUSFIELD et al., 1985; ATKINS, 1995; PEDERSEN., 1996; HAGGSTROM et al., 1997). A etiologia da DMVM continua desconhecida na maioria dos casos, mas a existência de uma base genética hereditária foi comprovada em cães da raça *Cavalier King Charles Spaniel*, em todas as idades (THRUSFIELD et al., 1985; HAGGSTROM et al., 1992; BEARDOW e BUCHANAN, 1993; WARE, 2000).

A DMVM apresenta diferentes denominações, incluindo endocardiose mitral, doença valvar degenerativa crônica, doença valvar crônica, transformação mixomatosa, esclerose nodular senil, valva frouxa, válvula em paraquedas ou em balão, protusão aneurismal, degeneração mucóide, síndrome da valva azul, ateromatose da valva mitral, fibrose valvar crônica, doença de *Barlow*, síndrome da cúspide redundante, deficiência fibroelástica, prolapso mitral e regurgitação ou insuficiência mitral adquirida (HELLWIG, 1942; POMERANCE, 1966; BITTAR; SOSA, 1968; POMERANCE, 1969; MCCARTHY e WOLF, 1970; DAVIS et al., 1971; KERN e TUKER., 1972; DAVIES et al., 1978; ETTINGER, 1992; KEENE, 1994) Contudo, Kittleson (1998) afirma que o nome apropriado para esta enfermidade é degeneração mixomatosa da valva mitral, já que os outros nomes são definições parciais de um evento, ou nomes antigos que não correspondem à verdadeira natureza dessa condição.

Na doença valvar degenerativa, a válvula mitral é a mais afetada, embora seja possível o acometimento, ainda que em menor frequência, da valva tricúspide. As válvulas acometidas apresentam-se espessadas e a fisiopatogenia acontece em razão

da degeneração do colágeno e substituição por tecido mixomatoso. Ademais, o estresse nas cúspides altera a função endotelial, provocando formações nodulares nas extremidades livres das valvas que, mais tardiamente, causam encurtamento dos folhetos, permitindo a regurgitação sanguínea. Apesar da DMVM ainda ser considerada de natureza não inflamatória e sua etiopatogenia ser complexa e não totalmente compreendida, especula-se sobre a participação dos mediadores inflamatórios no desenvolvimento dessa cardiopatia (RUSH e FREEMAN). Outra hipótese, baseada no estudo do músculo valvular estriado realizado por Sonneblich et al. (1966), cita que as mudanças degenerativas podem ser o resultado da pouca habilidade da valva mitral avascular em manter a tensão e alta pressão sistólica ventricular. Whitney (1974) resumiu que três fatores podem ser significativos na etiopatogenia da DMVM. Um deles é a fricção mecânica contínua, ou o impacto na área de contato, outro são os distúrbios na pressão sanguínea (hipertensão arterial ou hipotensão) e, finalmente, a hipóxia que pode estar associada à descompressão ou doença pulmonar crônica.

Um terço dos cães afetados pela DMVM possui lesão em ambas às válvulas. Cães com manifestações clínicas de ICC direita normalmente são acometidos por insuficiência da própria tricúspide ou hipertensão pulmonar causada por uma ICC esquerda, decorrente de edema pulmonar crônico e aumento da pressão intracapilar dos alvéolos. Essa condição dificulta a hematose e, destarte, promove aumento do trabalho ventricular direito e elevação da pressão da artéria pulmonar. Sinais clínicos comuns como ascite, efusão pleural e/ou pericárdica ou até obstrução dinâmica da via de saída da artéria pulmonar podem ocorrer (PEDERSEN e HAGGTROM, 2000; ABBOT, 2002).

Na evolução do processo degenerativo, o esqueleto de colágeno denso é substituído por tecido frouxo mixomatoso, permitindo a distensão das válvulas sob pressões hemodinamicamente normais, determinando prolapso ou afrouxamento valvular (POMERANCE; WHITNEY, 1970). O prolapso mitral pode ser indicativo das primeiras etapas da cardiopatia que, posteriormente, produzirá alongamento (ROBERTS et al., 1987), retração e incompetência valvar e, portanto, o começo da insuficiência ou regurgitação mitral (POCOCK, 1987). Esta, por sua vez, está

relacionada ao desenvolvimento de fibrose endocárdica, aumento atrial, congestão e estase sanguínea nas veias pulmonares, gerando um quadro de insuficiência cardíaca congestiva e edema pulmonar como frequentemente é visto. Embora não seja comum, também é possível a ocorrência de lacerações atriais, parciais ou totais, levando o paciente ao óbito (ATKINS et al., 2007; BORGARELLI et al., 2004).

Nos estágios iniciais da enfermidade cardíaca valvular, o alongamento de cordoalhas e a flacidez do tecido valvar causam prolapso da válvula mitral sem regurgitação. O processo posteriormente evolui, gerando falha de coaptação dos folhetos e regurgitação de sangue do ventrículo para o átrio, o que produzirá os sinais clínicos congestivos nos animais acometidos (MUCHA, 2001; ATKINS et al. 2007; BORGARELLI et al. 2004). O refluxo causado pela incompetência valvar traz uma série de alterações cardiovasculares (mudança de pressão arterial e volume), que se correlacionam com a sobrecarga volumétrica no lado afetado. Tal condição ativa os mecanismos compensatórios, a partir da redução de débito cardíaco e queda momentânea da pressão arterial sistêmica. Assim, a resposta reflexa simpática, com liberação de catecolaminas, leva ao aumento do inotropismo e da frequência cardíaca, bem como vasoconstricção periférica no sentido de compensar e manter a pressão arterial sistêmica (MUCHA, 2001).

Num segundo momento, na tentativa de manter a pressão arterial (PA) e a perfusão tecidual, é ativado o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), tendo como contraponto o aumento dos peptídeos natriuréticos, que são liberados em virtude do maior estiramento das fibras miocárdicas pela sobrecarga de volume, isto é, aumento da pré-carga (WARE, 2007). Durante a ativação do SRAA há maior liberação de renina pelos rins, devido à redução do fluxo sanguíneo renal. Dessa forma há maior formação de angiotensina I (AI), pela ação direta da renina sobre o angiotensinogênio no leito vascular. Por sua vez, o decapeptídeo AI é convertido no octapeptídeo angiotensina II (AII), pela enzima conversora de angiotensina (ECA), um exopeptidase que catalisa a remoção do dipeptídeo do terminal carboxílico de substratos polipeptídicos. Anteriormente foi evidenciado que a fonte de AII era o leito vascular pulmonar, visto que em tal onde se encontrava a maior atividade da ECA. Contudo,

atualmente se sabe que essa enzima está presente na maioria dos leitos vasculares e em vários tecidos e órgãos, incluindo os rins, células de Leydig, macrófagos ativados e várias regiões do cérebro, embora o leito vascular pulmonar permaneça como responsável pela maior parte da conversão da AI circulante em AII (SKEGGS et al., 1956; SOFFER, 1976; ESTHER et al., 1997). Posteriormente, a ECA inativa o nonapeptídeo bradicinina (BK), que tem ação vasodilatadora e natriurética, tendo como outros substratos as encefalinas, neurotensina, substância P e GNRh (SKIDGEL et al., 1984).

A AII tem efeito inotrópico positivo, devido ao aumento de influxo de cálcio durante a excitação cardíaca, atuando diretamente em receptores tipo 1 da angiotensina nos cardiomiócitos. Além disso, é um potente vasoconstritor que ajuda a manter a PA e estimula a secreção de aldosterona que, por sua vez, promove a retenção de sódio e água nos túbulos coletores renais e a excreção de íons K^+ e H^+ , aumentando o volume plasmático e a pré-carga (HAMLIN, 1981; SKIDGEL et al., 1984; KITTLESON, 1998). A AII é um dos mais potentes vasoconstritores e peptídeos mitogênicos produzidos sistemicamente e localmente no coração, pulmões, rins e endotélio, como resultado da presença da ECA. A ICC tem como uma das suas características o aumento das concentrações teciduais e circulantes de AII, que trabalha em favor do aumento da pós-carga e causa hipertrofia celular com o tempo promove depósito de colágeno tipo III no interstício, causando atrofia de miócitos, apoptose, fibrose intersticial, remodelamento cardíaco e vascular. A aldosterona também desempenha papel importante no remodelamento cardíaco, pois ativa o RNAm de fibroblastos, causando sua proliferação e a deposição de colágeno. Essas alterações aumentam o endurecimento passivo dos ventrículos e do leito arterial, interferindo no enchimento ventricular e reduzindo a complacência arterial. A aldosterona também exerce ação na mucosa entérica, exacerbando a retenção de sódio, que permanece baixo na ICC por diluição atribuída à vasopressina, com o sódio aumentado sendo retido no meio extravascular (SERRO AZUL et al., 1977). Esses mecanismos de retenção de íons sódio e de água, ao agirem cronicamente, contribuem para a evolução dos sinais

clínicos congestivos observados nos pacientes com ICC, tais como dispnéia, tosse, intolerância ao exercício e efusão pleural (CAMACHO,1996).

A produção neuro-humoral promove o estiramento mecânico, leva à perda de miócitos cardíacos e à ativação de metaloproteinases que degradação da matriz extracelular, causando apoptose remodelamento ventricular, o qual constitui a base da progressão da disfunção miocárdica, caracterizando a ICC. Ativação adrenérgica e do SRAA está intrinsecamente ligada a este processo contribuindo com múltiplos efeitos adversos. A endotelina-1 (ET-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) também têm também sido implicados em muitos desses efeitos, introduzindo o conceito que mecanismos inflamatórios possam contribuir para a progressão da ICC (SERRO AZUL et al.,1977). Sabe-se, por exemplo, que diversos mediadores inflamatórios podem afetar negativamente o sistema cardiovascular por causarem hipertrofia de miócitos cardíacos, fibrose, além de exercerem efeitos inotrópicos negativos (ORAL et al., 1995; FREEMAN e RUSH, 2006).

Citocinas inflamatórias e ICC foram correlacionadas em seres humanos por Levine et al. (1990), Dutra et al. (1993) e Anker et al. (2004), porém, a estimulação para o estado inflamatório na ICC ainda permanece desconhecida. Segundo Boswood (2009), as hipóteses relacionadas a este fato incluem o aumento na produção de citocinas pelo miocárdio em resposta ao estímulo adrenérgico, inflamação em resposta à necrose tecidual após infarto miocárdico, resposta tecidual à diminuição crônica levando a um quadro de má perfusão e alterações da permeabilidade intestinal, e com isso aumento do número de bactérias no intestino mal perfundido. Chen et al. (2008) também afirmaram que a lesão miocárdica que acompanha pacientes com insuficiência cardíaca congestiva tem curso atribuído à ativação do sistema inflamatório, com produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, ativação do sistema complemento, produção de anticorpos. A ICC, quando descompensada, modifica o curso da insuficiência cardíaca crônica e os resultados se agravam por meio de uma combinação de mecanismos potenciais, incluindo a ativação neuro-hormonal, apoptose e a cascata inflamatória. Citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- e IL-6, desempenham papel

etiopatogênico na ICC crônica, de tal forma que a terapia com anti-inflamatórios vem sendo investigada há algum tempo.

Considerando o processo inflamatório na etiopatogenia da endocardiose, Mow et al. (1999) demonstraram aumento da expressão de receptores de endotelina nos folhetos valvares de cães com DMVM. A endotelina, por sua vez, está diretamente envolvida em processos inflamatórios por ativar o NF-Kapa-beta, um fator de transcrição que aumenta a produção de mediadores inflamatórios (MULLER et al., 2003). Em seres humanos, há crescente interesse no estudo da produção de citocinas em quadros de ICC com edema pulmonar decorrentes de DMVM, por se acreditar que sejam fatores implicados na evolução e progressão dessa enfermidade. Muitas pesquisas têm como foco a variação nas citocinas circulantes, mormente o fator de necrose tumoral alfa e as interleucinas 1, 4 e 6, os quais tem se mostrado ativos durante as cardiopatias (DIBBS et al., 1999).

Alguns estudos relatam que a ativação neuro-humoral e das citocinas pró-inflamatórias em pacientes humanos com ICC decorrem do desequilíbrio das vias anabólicas e catabólicas (HAEHLING et al., 2007; SLUPE et al., 2008). Assim, o desenvolvimento de anorexia, aumento do requerimento energético e do catabolismo da massa corporal aparentemente estão relacionados ao fator de necrose tumoral e às interleucinas (ORAL et al., 1995; FREEMAN e RUSH, 2006). Outro fator a ser considerado refere-se ao estado catabólico que acompanha a síndrome ICC, a qual pode levar à perda e atrofia de massa muscular, sendo características a chamada caquexia cardíaca a intensa perda de peso associada à perda de massa muscular, fadiga e fraqueza. A prevalência de caquexia em seres humanos com ICC varia de 13 a 36% (STRASSBURGER e ANKER 2006). Em cães, sabe-se da ocorrência de caquexia cardíaca relacionada à ICC, uma vez que neste estado, a principal fonte energética do organismo provém de aminoácidos musculares, resultando em perda intensa de massa muscular. Na caquexia cardíaca dos cães a perda de massa muscular é observada inicialmente na musculatura epaxial, glútea, escapular e temporal (FREEMAN e RUSH, 2006).

Segundo Boswood (2009), há fortes evidências de que o estímulo inflamatório em cães com ICC possa, assim como em seres humanos, representar um alvo terapêutico e indicador de prognóstico da ICC. A proteína C reativa é um marcador de inflamação amplamente utilizado em seres humanos para caracterizar pessoas em risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, outros marcadores também têm sido utilizados, tais como IL-1, IL-6, IL-10 e TNF-alfa. Adicionalmente, outro fator implicado como fator prognóstico negativo é a estimulação do SRAA, que atua como indutor ao estresse oxidativo, com produção de óxido nítrico, remodelamento vascular e ativação imune, o que desencadeia apoptose e necrose celular (STRASBURGER e ANKER, 2006), com consequente substituição do tecido lesado por fibrose (FILIPPATOS et al., 2003).

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como escopo determinar as concentrações séricas das citocinas inflamatórias IL-1 e IL-4, correlacionando-as com os indicadores ecodopplercardiográficos de função cardíaca em cães com degeneração mixomatosa da valva mitral e diferentes graus de insuficiência cardíaca congestiva.

4. JUSTIFICATIVAS

As enfermidades cardíacas, mormente a DMVM em cães, estão relacionadas à elevada mortalidade e morbidade. Considerando-se que a maioria das cardiopatias em cães é progressiva e incurável, pesquisas recentes vêm sendo desenvolvidas no sentido de melhorar o prognóstico dessas afecções e aumentar qualidade de vida dos pacientes acometidos.

As citocinas inflamatórias têm sido implicadas diretamente na fisiopatologia da inflamação que acompanha a enfermidade cardíaca em seres humanos, promovendo, ademais, efeitos diretos sobre o miocárdio, incluindo hipertrofia, fibrose e inotropismo negativo. Dessa forma, tais substâncias têm sido utilizadas na avaliação prognóstica da ICC em pacientes humanos. Portanto, neste estudo vislumbrou-se a determinação de seus valores séricos em cães com enfermidade degenerativa mitral e, a identificação de correlação entre tais biomarcadores e os indicadores ecodopplercardiográficos de função cardíaca.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Laboratórios

As atividades experimentais foram realizadas nos Laboratórios de Cardiologia, Patologia Clínica e Radiologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HVGLN) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* de Jaboticabal, SP. A dosagem das citocinas foi terceirizada, sendo desenvolvida pelo Laboratório Gênese em São Paulo, SP.

5.2. Grupos experimentais

Para a realização do estudo, foram arrolados 12 cães adultos, de idades variadas de ambos os sexos e portadores de DMVM cujo diagnóstico foi previamente estabelecido pelo Serviço de Cardiologia do HVGLN, valendo-se de exame físico, radiográfico, eletrocardiográfico e ecocardiográfico. Cães portadores de outras enfermidades, bem como aqueles que faziam uso de quaisquer medicamentos foram excluídos do estudo. Ademais, foi constituído um grupo controle (GC) com 9 cães adultos clinicamente saudáveis, a partir da rotina do Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais e Laboratório de Nutrição Clínica do HVGLN.

Os cães portadores de DMVM (n=12) foram alocados em dois grupos, a saber: sendo Glb (n=7), composto por cães portadores de DMVM e ICC classe funcional Ib; e GII (n=5), composto por cães portadores de DMVM e ICC classe II, por serem cães que apresentam remodelamento cardíaco já. A classificação da ICC foi baseada nos critérios recomendados pelo *International Small Animal Cardiac Health Council* (ISACHC).

5.3. Métodos

5.3.1. Avaliação ecodopplercardiográfica

Foi empregado ecodopplercardiógrafo equipado com transdutor multifrequencial 5,0 – 7,5 MHz , sendo os dados armazenados na memória do aparelho para realização das medidas e cálculos ao término do exame. Com o animal posicionado em decúbito lateral direito, localizou-se a janela paraesternal direita. A partir da visualização bidimensional do ventrículo esquerdo em eixo transversal, foram obtidas imagens em modo-M em plano cordal e mitral, para mensuração do diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole (DIV_{Es}) e diástole (DIV_{Ed}), espessura do septo interventricular na sístole (SIV_{s}) e diástole (SIV_{d}), espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na sístole ($PLVE_{s}$) e diástole ($PLVE_{d}$). Ainda na mesma janela ecocardiográfica em eixo transversal, o transdutor foi inclinado dorsalmente até que fosse visualizada a artéria pulmonar e, em tal imagem, o cursor Doppler foi posicionado distalmente à válvula pulmonar, permitindo a mensuração do pico de velocidade do fluxo pulmonar ($V_{maxPulm}$) pelo Doppler pulsado. Inclinando-se ainda mais dorsalmente o transdutor, foi obtida a imagem do átrio esquerdo e aorta, sendo então determinados os diâmetros do átrio esquerdo (AE) e da artéria aorta (Ao).

Com o animal posicionado em decúbito lateral esquerdo foi obtida a imagem apical quatro câmaras, pela janela parasternal esquerda, permitindo a mensuração, por Doppler tecidual, das velocidades miocárdicas longitudinais máximas no início da diástole ventricular (E'), na sístole atrial (A') e na sístole ventricular (S). Para todos esses parâmetros foram obtidos valores com o cursor posicionado nas bordas lateral (E'_{lat} , A'_{lat} e S_{lat}) e septal (E'_{sep} , A'_{sep} e S_{sep}) do anel mitral. Nessa mesma imagem, foi mensurado o pico de velocidade do enchimento ventricular esquerdo rápido (onda V_{maxE}) e lento (onda V_{maxA}), posicionando-se o cursor do Doppler pulsado na extremidade dos folhetos da valva mitral durante sua abertura. Na imagem apical cinco câmaras obtida, pela mesma janela, mensurou-se o pico de velocidade do fluxo

transaórtico ($V_{\max}A_o$). O fluxo integral das velocidades do fluxo aórtico (FVI_{A_o}) e o tempo de ejeção ventricular esquerda (TEVE) foram determinados contornando-se o envelope do espectro aórtico.

Diversos índices ecodopplercardiográficos foram calculados com as variáveis obtidas, incluindo espessamento fracional do septo interventricular ($SIV_{\%}$), espessamento fracional da parede livre do ventrículo esquerdo ($PLVE_{\%}$), fração de ejeção ($FEJ_{\%}$), fração de encurtamento ($FEC_{\%}$), relação entre $V_{\max}E$ e $V_{\max}A$ ($V_{\max}E/V_{\max}A$), relação entre E' e A' septal ($E'_{\text{sep}}/A'_{\text{sep}}$) e lateral ($E'_{\text{lat}}/A'_{\text{lat}}$), relação entre $V_{\max}E$ e E' lateral ($V_{\max}E/E'_{\text{lat}}$), relação entre $V_{\max}E$ e E' septal ($V_{\max}E/E'_{\text{sep}}$), $V_{\max}A$ e A' lateral ($V_{\max}A/A'_{\text{lat}}$) e $V_{\max}A$ e A' septal ($V_{\max}A/A'_{\text{sep}}$).

Para todos os parâmetros, os resultados das mensurações ecocardiográficas foram consideradas como a média de três ciclos cardíacos consecutivos. Para os parâmetros doppler, procurou-se melhorar o direcionamento do cursor por meio do sinal de áudio, visando maximizar o espectro do pico de velocidade do fluxo sanguíneo e obter o tom mais puro.

5.3.2. Dosagem das citocinas

Para todos os animais procedeu-se a colheita do sangue venoso sem anticoagulante, permitindo a obtenção de soro que foi apropriadamente estocado a -80°C até o momento da análise das citocinas. O material congelado foi remetido ao laboratório Gênese, em São Paulo, (SP), para dosagem das interleucinas. Para IL- 1 β foi empregado o *kit* E90563Ca (lote L121115381), produzido pela empresa USCN. Para IL- 4 utilizou-se o *kit* da empresa USCN. Ambos os *kits* empregam a metodologia ELISA, cuja leitura foi realizada no equipamento *Stat Fax* (modelo 2600) e os cálculos realizados no programa *MultiCalc*. A leitora foi calibrada valendo-se de cinco padrões (Figura 1) fornecidos pelo fabricante dos *kits*, sendo a sensibilidade para detecção de IL-1 β e IL-4 igual a 5,8 pg/mL e 6,0 pg/mL, respectivamente.

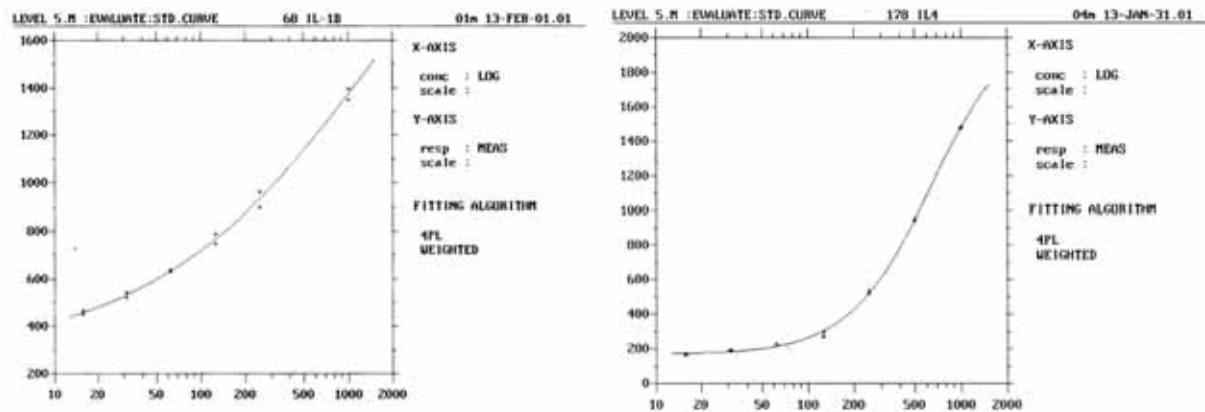


Figura 1. Curvas de calibração da leitora ELISA para determinação das concentrações séricas das interleucinas 1 β (esquerda) e 4 (direita). Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

5.4. Análise estatística

Os dados foram analisados valendo-se de análise de variância, seguida do teste de Tukey (para dados com distribuição normal), ou do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn (quando pelo menos um dos grupos não seguiu distribuição normal), para comparação entre as médias dos parâmetros avaliados, visando constatar a existência ou não de diferenças entre os grupos experimentais comparativamente ao grupo controle. Para a correlação dos valores das citocinas com os parâmetros ecodopplercardiográficos de função cardíaca foi empregado o teste de correlação de Spearman. Em todas as análises considerou-se o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo (RAO, 1998).

A análise estatística foi inteiramente realizada com o programa Graphpad Prism[®] versão 3.00 para Windows, desenvolvido pela Graphpad Software[®], San Diego, Califórnia (2007).

6. RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa encontram-se arrolados nas tabelas 1 a 8. Os parâmetros cuja análise estatística se mostrou significativa também estão representados sob a forma gráfica nas figuras 2 a 9.

A tabela 1 mostra os valores médios e desvios padrão das variáveis ecocardiográficas $DIVE_s$, $DIVE_d$, $ESIV_s$, $ESIV_d$, $PLVE_s$ e $PLVE_d$, todas indexadas por área de superfície corporal. Os resultados evidenciam aumento gradativo nos valores estudados de acordo com a classe funcional da ICC comparativamente ao grupo controle. Entretanto, somente os itens $DIVE_d$, $ESIV_s$ e $ESIV_d$ apresentaram diferenças significativas entre os cães de classe II em relação aos outros dois grupos, demonstrando que cães com DMVM apresentam alterações morfológicas consideráveis.

Tabela 2. Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância das variáveis ecocardiográficas dos cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Variável (indexada por ASC)	Classe Funcional			P (ANOVA)
	GC (controle)	Glb (classe Ib)	GII (classe II)	
$DIVE_s$	36,34±11,63 ^A	39,29±8,71 ^A	40,96±6,51 ^A	0,6746
$DIVE_d$	49,28±7,38 ^A	62,17±11,38 ^{AB}	71,26±18,43 ^B	0,0110
$ESIV_s$	23,01±5,17 ^A	23,40±2,90 ^A	32,46±6,41 ^B	0,0060
$ESIV_d$	18,20±5,41 ^A	19,73±3,43 ^{AB}	28,96±10,73 ^B	0,0232
$PLVE_s$	23,41±5,72 ^A	22,00±5,49 ^A	32,28±15,45 ^A	0,1333
$PLVE_d$	18,50± 5,20 ^A	16,27± 3,84 ^A	24,70± 12,35 ^A	0,1489

Letras diferentes na mesma linha: diferença significativa entre grupos.

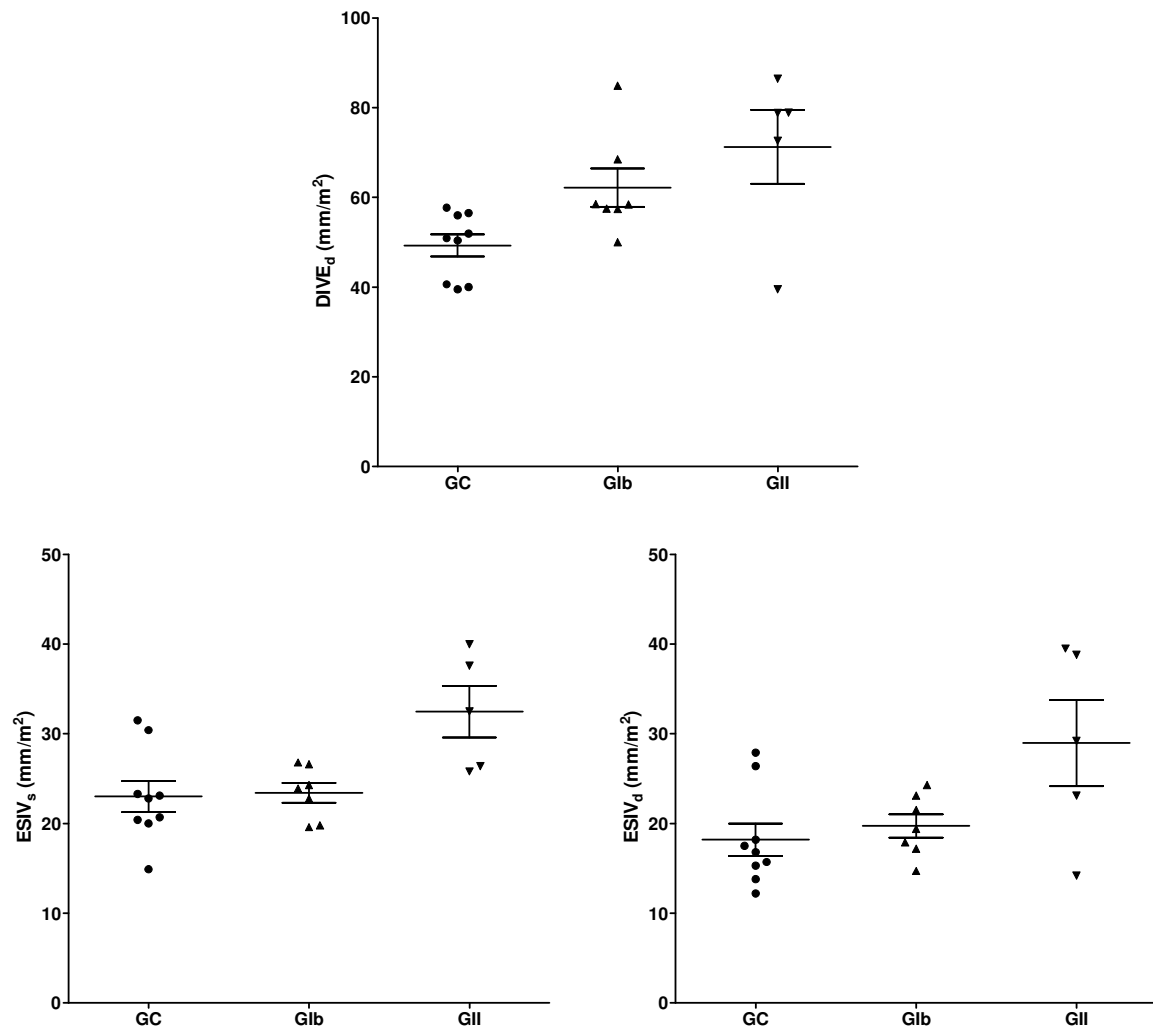


Figura 1. Representação gráfica das médias dos parâmetros ecocardiográficos obtidos em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

No tocante às variáveis calculadas a partir de parâmetros derivados da ecocardiografia em modo-M, os dados apresentados na tabela 4 evidenciam diferença significativa apenas em relação à variável AE/Ao, demonstrando aumento significativo do átrio esquerdo quando comparados o grupos Ib e II com o grupo controle. Este fato reflete claramente o remodelamento cardíaco atrelado ao quadro congestivo que

acompanha a progressão natural da degeneração mixomatosa da valva mitral em cães. A figura 3 ilustra a comparação entre as médias desse parâmetro especificamente.

Tabela 2. Valores médios, desvios padrão dos parâmetros calculados a partir de variáveis ecocardiográficas obtidas em modo-B e modo-M em cães DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Variável	Classe Funcional			P
	GC (controle)	Glb (classe Ib)	GII (classe II)	
AE/Ao	1,16± 0,05 ^A	1,77± 0,32 ^B	2,20± 0,75 ^B	0,0004*
FEC%	37,44±5,59 ^A	37,14±9,53 ^A	45,40±6,43 ^A	0,1251
FEJ%	68,89±6,64 ^A	67,14±10,93 ^A	77,60±6,11 ^A	0,1008
SIV%	39,00±18,26 ^A	39,29±27,59 ^A	15,80±18,05 ^A	0,1413
PLVE%	24,67±13,58 ^A	36,43±32,32 ^A	47,00±37,50 ^A	0,3741*

Letras diferentes na mesma linha: diferença significativa entre grupos.

* p obtido pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (pelo menos um dos grupos não passou no teste de normalidade)

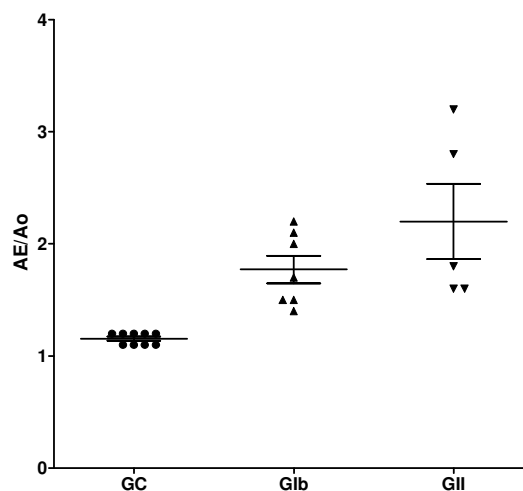


Figura 3 . Representação gráfica das médias da relação AE/Ao obtido em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Em relação às variáveis ecodopplercardiográficas pelo Doppler pulsado, foram verificadas diferenças estatísticas nos parâmetros pico de velocidade do fluxo pulmonar ($V_{\max}\text{Pulm}$) e fluxo integral das velocidades aórticas (FVI_{Ao}) entre os grupos de cães avaliados. Outrossim, verifica-se claramente uma redução importante dos valores dos diferentes parâmetros estudados nos cães de classe funcional II quando comparados aos cães do grupo controle e classe Ib. Este fato ilustra a redução desses parâmetros de acordo com o tempo de evolução da cardiopatia.

Tabela 4. Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância das variáveis ecocardiográficas doppler dos cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Variável	Classe Funcional			P
	GC (controle)	Glb (classe Ib)	GII (classe II)	
$V_{\max}\text{Pulm}$	84,88±10,23 ^A	83,79±13,01 ^A	49,92±6,96 ^B	<0,0001
$V_{\max}\text{E}$	74,49±12,45 ^A	88,04±18,01 ^A	84,02±35,16 ^A	0,2887*
$V_{\max}\text{A}$	50,28±14,19 ^A	79,80±20,23 ^B	66,66±22,55 ^{AB}	0,0279*
$V_{\max}\text{Ao}$	87,84±12,77 ^A	83,61±17,39 ^A	66,28±15,03 ^A	0,0697*
FVI_{Ao}	12,34±2,46 ^{AB}	12,44±2,67 ^A	8,82±2,22 ^B	0,0381
TEVE	151,70±18,59 ^A	159,50±15,95 ^A	136,00±35,62 ^A	0,2366
TRIV	93,67±15,30 ^A	85,29±23,24 ^A	49,60±14,76 ^B	0,0013

Letras diferentes na mesma linha: diferença significativa entre grupos.

* p obtido pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (pelo menos um dos grupos não passou no teste de normalidade)

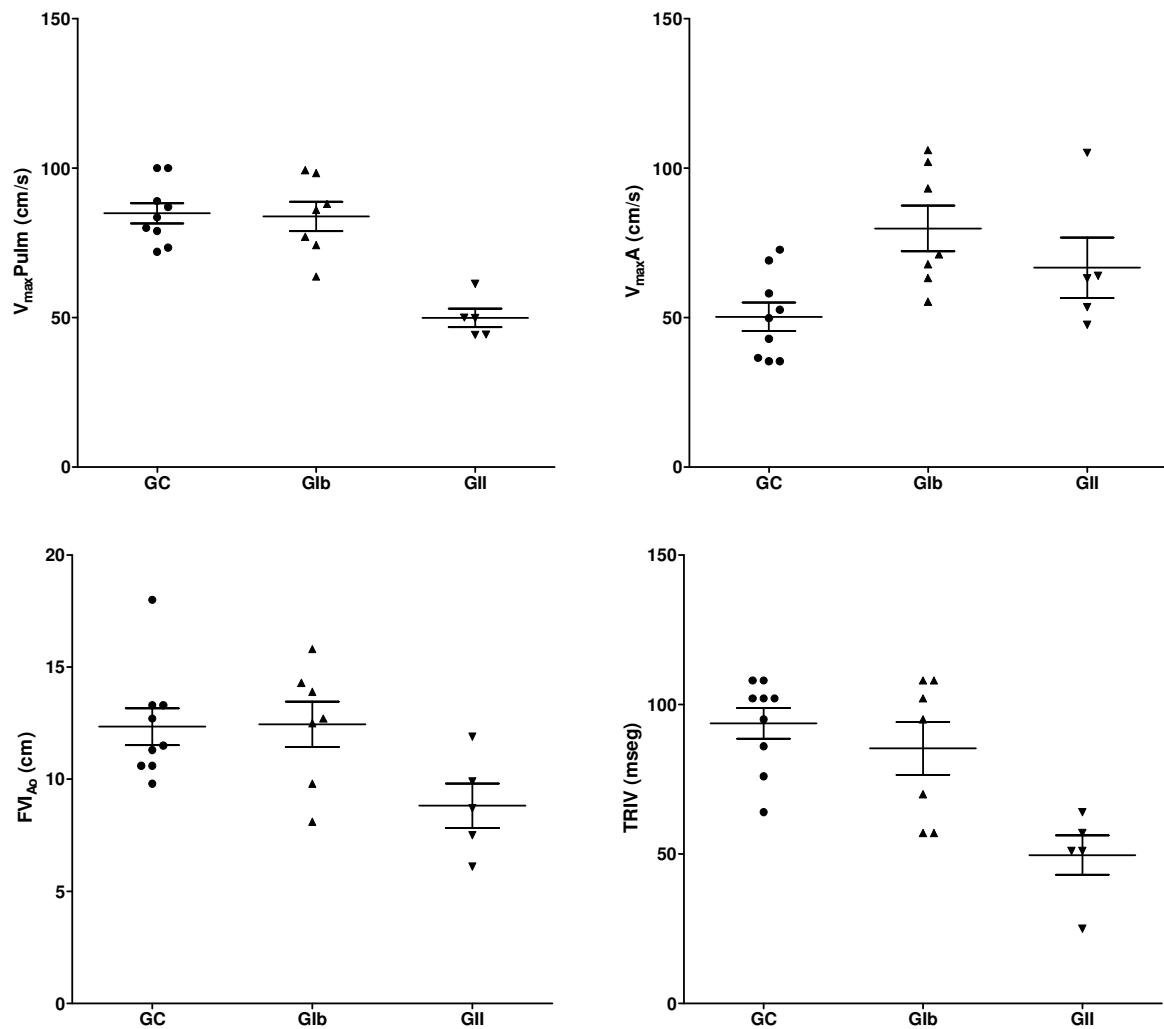


Figura 4. Representação gráfica das médias dos parâmetros ecocardiográficos doppler obtidos em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

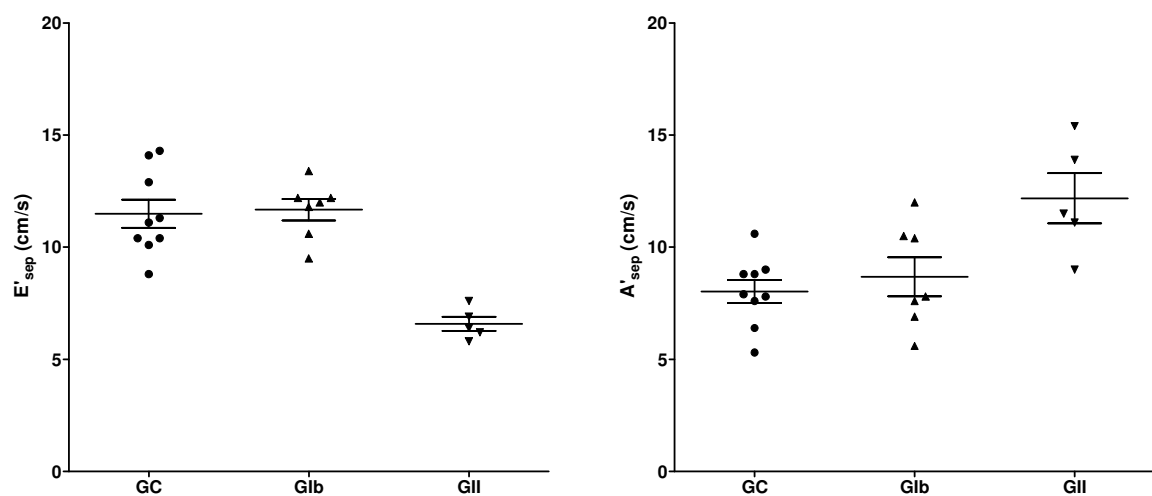
Com relação aos parâmetros obtidos por doppler tecidual, foram constatadas diferenças significativas entre grupos nas variáveis E'_{sep} , A'_{sep} , E'_{lat} e A'_{lat} . Tais resultados possivelmente refletem as modificações estruturais e hemodinâmicas que acompanham a progressão da enfermidade mitral com insuficiência cardíaca.

Os parâmetros calculados $V_{max}E/E'_{lat}$, $V_{max}E/E'_{lat}$, E'_{lat}/A'_{lat} e E'_{sep}/A'_{sep} mostraram diferenças significativas à luz da análise estatística.

Tabela 5. Valores médios, desvios padrão das variáveis obtidas por doppler tecidual nos cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Variável	Classe Funcional			<i>P</i> (ANOVA)
	GC (controle)	Glb (classe Ib)	GII (classe II)	
E'_{sep}	11,49±1,88 ^A	11,67±1,26 ^A	6,58±0,69 ^B	<0,0001
A'_{sep}	8,02±1,54 ^A	8,69±2,30 ^A	12,18±2,50 ^B	0,0058
S_{sep}	13,14±2,45 ^A	14,53±3,16 ^A	15,68±2,71 ^A	0,2668
E'_{lat}	13,53±1,73 ^A	13,13± 1,13 ^{AB}	10,38± 3,58 ^B	0,0441
A'_{lat}	7,88±1,58 ^A	9,84±2,68 ^A	15,18±3,80 ^B	0,0003
S_{lat}	14,13±3,19 ^A	14,14±2,36 ^A	14,02±2,86 ^A	0,9968

Letras diferentes na mesma linha: diferença significativa entre grupos.



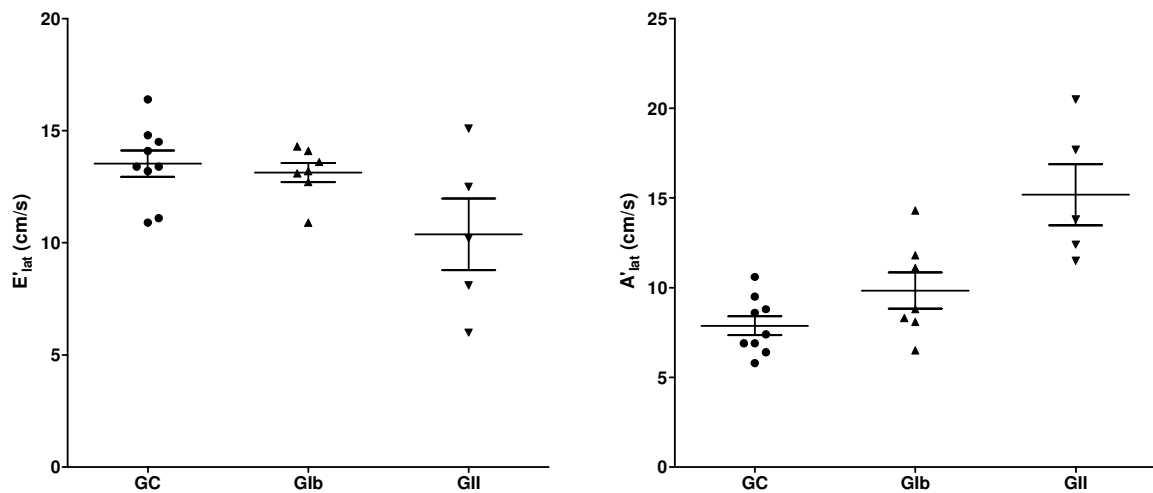


Figura 5. Representação gráfica das médias dos parâmetros obtidos por doppler tecidual em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Tabela 6. Valores médios, desvios padrão das variáveis obtidas por doppler tecidual dos cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Variável	Classe Funcional			P
	GC (controle)	Glb (classe Ib)	GII (classe II)	
$V_{max}E/E'_{sep}$	$6,24 \pm 2,39^A$	$6,37 \pm 1,29^A$	$10,24 \pm 3,93^B$	0,0255
$V_{max}E/E'_{lat}$	$5,47 \pm 1,54^A$	$6,17 \pm 1,68^A$	$9,46 \pm 3,37^B$	0,0105
$V_{max}A/A'_{sep}$	$7,52 \pm 3,34^A$	$10,74 \pm 3,69^A$	$8,14 \pm 3,35^A$	0,1524*
$V_{max}A/A'_{lat}$	$6,50 \pm 2,12^A$	$9,36 \pm 3,94^A$	$6,72 \pm 3,59^A$	0,1941
E'_{sep}/A'_{sep}	$1,46 \pm 0,33^A$	$1,29 \pm 0,56^A$	$0,56 \pm 0,17^B$	0,0028
E'_{lat}/A'_{lat}	$1,52 \pm 0,37^A$	$1,11 \pm 0,26^{AB}$	$0,68 \pm 0,36^B$	0,0010

Letras diferentes na mesma linha: diferença significativa entre grupos.

* p obtido pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (pelo menos um dos grupos não passou no teste de normalidade)

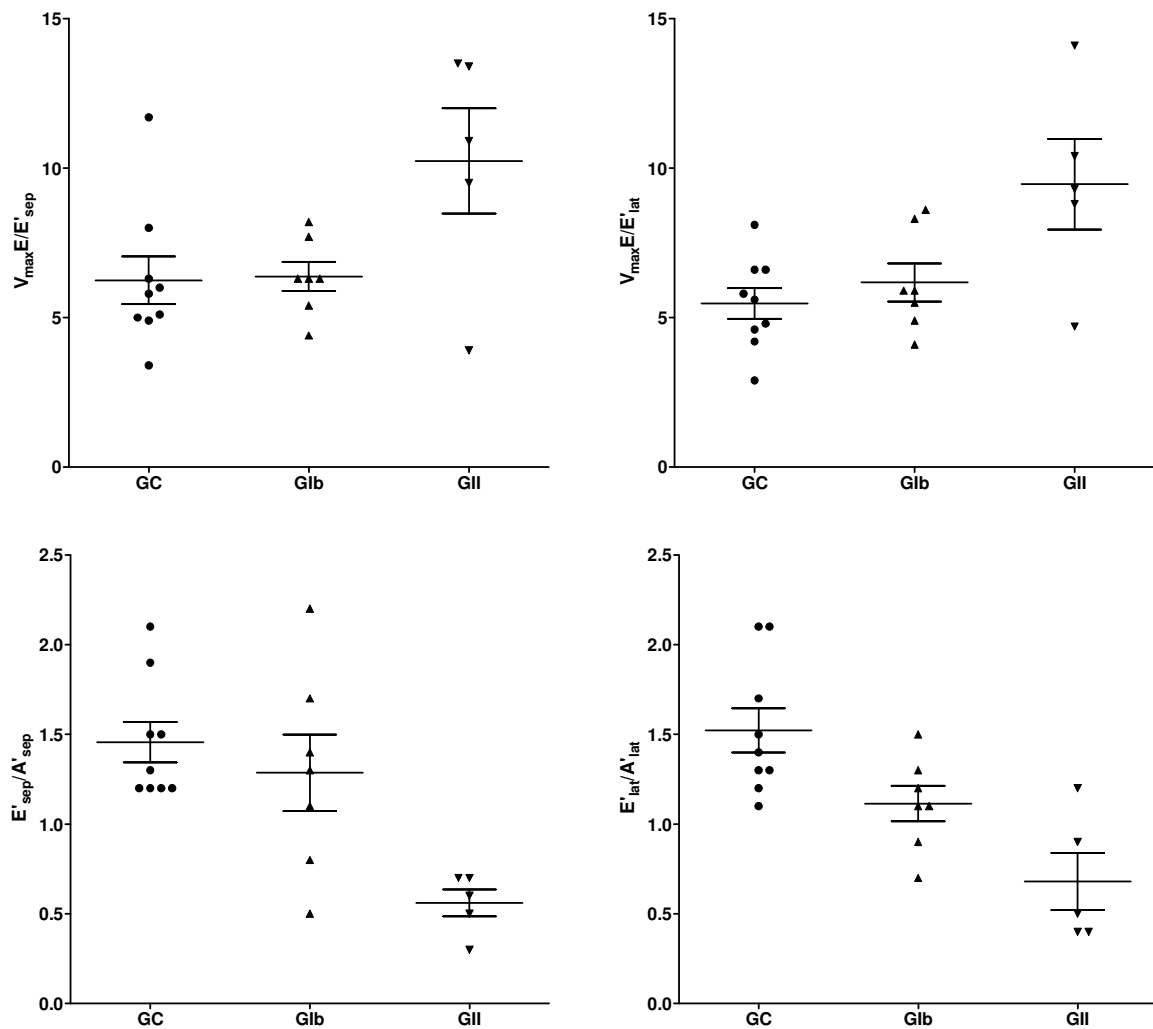


Figura 6. Representação gráfica das médias dos parâmetros calculados a partir de variáveis doppler em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

As análise das concentrações séricas das interleucinas se mostrou significativa apenas para IL-1 β . No tocante à IL-4, cabe destacar o expressivo número de amostras cujo resultado situou-se fora da faixa de sensibilidade do *kit* empregado.

Tabela 7. Medianas, percentis (25/75) das concentrações séricas das interleucinas 1 e 4 em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Variável	Classe Funcional			P
	GC (controle)	Glb (classe Ib)	GII (classe II)	
IL-1β	10,50 (3,78-14,53) ^{A (1)}	0,40 (0,39-0,91) ^B	10,05 (1,94-179,10) ^{AB}	0,0094*
IL-4	28,96 (0,00-73,42) ^{A (2)}	0,00 (0,00-0,00) ^{A (3)}	0,00 (0,00-68,45) ^{A (4)}	0,0820*

Letras diferentes na mesma linha: diferença significativa entre grupos.

* p obtido pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (pelo menos um dos grupos não passou no teste de normalidade)

(1) 1 animal com resultados inferiores à sensibilidade do *kit* (5,8 pg/mL)

(2) 4 animais com resultados inferiores à sensibilidade do *kit* (6,0 pg/mL)

(3) Todos os animais com resultados inferiores à sensibilidade do *kit* (6,0 pg/mL)

(4) 3 animais com resultados inferiores à sensibilidade do *kit* (6,0 pg/mL) e 1 animal com resultado superior ao último calibrador da curva (1000 pg/mL)

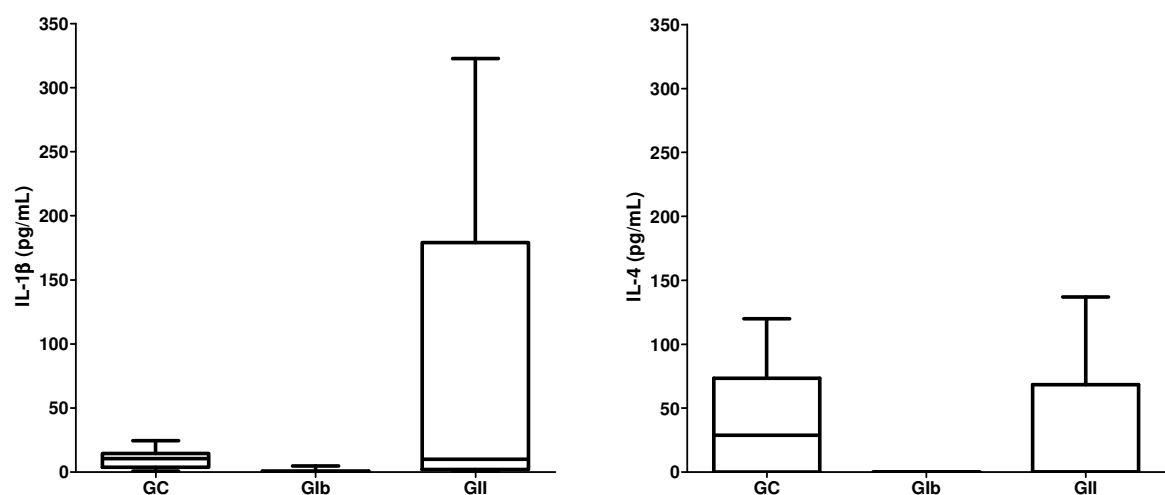


Figura 7. Representação gráfica das medianas, percentis (25/75), valores mínimos e máximos das concentrações séricas das interleucinas 1 e 4 em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

A correlação entre as concentrações séricas das interleucinas e os demais parâmetros ecocardiográficos se mostrou significativa apenas entre IL-1 β e as frações de encurtamento e ejeção e a velocidade máxima da onda A do fluxo mitral. Esta última também apresentou correlação significativa com a concentração sérica de IL-4. Adicionalmente, procedeu-se a transformação logarítmica das concentrações das interleucinas, possibilitando nova rodada de análise de correlação, cujos resultados não se mostraram significativos para quaisquer dos parâmetros avaliados.

Tabela 8. Coeficientes de correlação entre as concentrações séricas das interleucinas 1 β e 4 e as variáveis ecocardiográficas (modo B e modo M) obtidas em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Variável	IL-1 β *		IL-4*	
	r	P	r	P
DIVE_s	0,0695	0,7646	-0,1775	0,4414
DIVE_d	0,0740	0,7497	-0,1490	0,5191
ESIV_s	0,2189	0,3404	0,0977	0,6734
ESIV_d	-0,0604	0,7947	0,1685	0,4651
PLVE_s	0,0857	0,7118	0,0097	0,9664
PLVE_d	0,0272	0,9065	0,2751	0,2274
AE/Ao	-0,1102	0,6342	-0,4310	0,0510
FEC_%	0,4617	0,0350	0,1899	0,4094
FEJ_%	0,4694	0,0317	0,1654	0,4735
SIV_%	0,1469	0,5250	-0,2102	0,3602
PLVE_%	0,3178	0,1602	-0,0545	0,8141

* Coeficiente de correlação calculado pelo teste de Spearman (IL-1 β e IL-4 não passaram no teste de normalidade)

Tabela 9. Coeficientes de correlação entre as concentrações séricas das interleucinas 1 β e 4 e as variáveis ecocardiográficas doppler obtidas em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

Variável	IL-1 β *		IL-4*	
	r	P	r	P
V _{max} Pulm	-0,3020	0,1832	0,1449	0,5307
V _{max} E	-0,2242	0,3284	-0,3104	0,1708
V _{max} A	-0,4559	0,0377	-0,5154	0,0167
V _{max} Ao	-0,0571	0,8055	0,2125	0,3550
FVI _{Ao}	-0,2821	0,2152	-0,0521	0,8223
TEVE	-0,0578	0,8031	-0,2470	0,2803
TRIV	-0,0884	0,7030	-0,0205	0,9296
E' _{sep}	-0,2638	0,2478	-0,0293	0,8995
A' _{sep}	0,3875	0,0826	-0,1703	0,4603
S _{sep}	-0,2508	0,2728	0,0716	0,7575
E' _{lat}	0,2321	0,3113	0,1377	0,5515
A' _{lat}	0,2248	0,3271	-0,1327	0,5661
S _{lat}	-0,2925	0,1980	0,0578	0,8032
V _{max} E/E' _{sep}	-0,0501	0,8290	-0,1812	0,4315
V _{max} E/E' _{lat}	0,0311	0,8932	-0,1954	0,3957
V _{max} A/A' _{sep}	-0,3428	0,1281	-0,3451	0,1254
V _{max} A/A' _{lat}	-0,3871	0,0829	-0,3631	0,1056
E' _{sep} /A' _{sep}	-0,1656	0,4728	0,1406	0,5431
E' _{lat} /A' _{lat}	0,0052	0,9820	0,2282	0,3195

* Coeficiente de correlação calculado pelo teste de Spearman (IL-1 β e IL-4 não passaram no teste de normalidade)

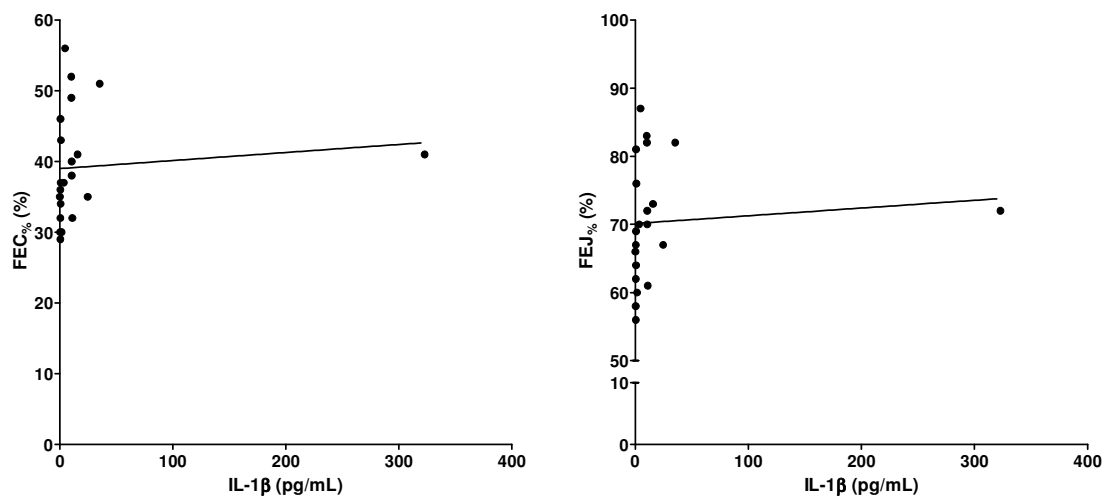


Figura 8. Representação gráfica da correlação significativa entre concentração sérica das interleucina 1 β e as frações de encurtamento e ejeção obtidas em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

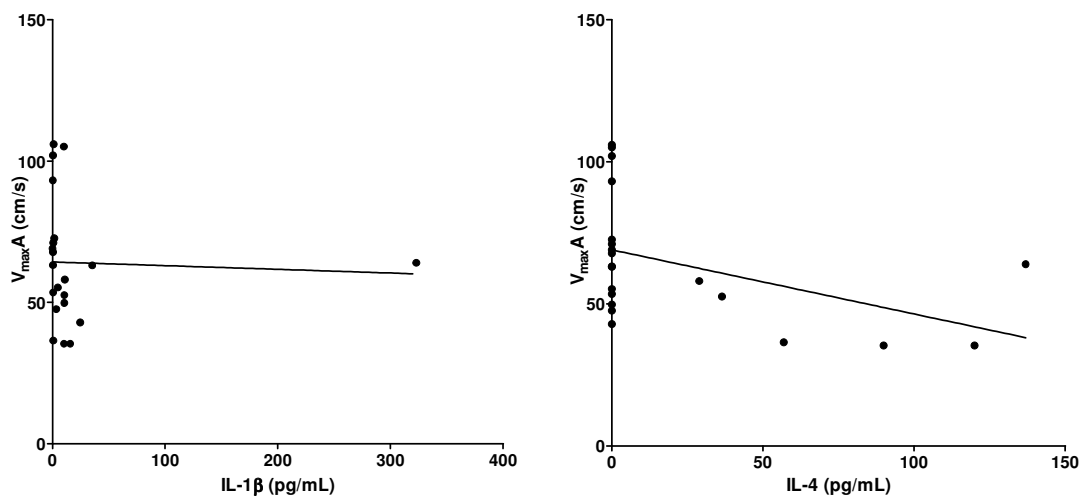


Figura 9. Representação gráfica da correlação significativa entre concentração sérica das interleucinas 1 β e 4 e a velocidade máxima da onda A do fluxo mitral obtida em cães acometidos por DMVM. Unesp, Jaboticabal, SP (2013).

7. DISCUSSÃO

O exame ecodopplercardiográfico foi realizado segundo a técnica descrita por Muzzi et al. (1999), Kienle e Thomas (2004) e Boon (2011), procurando-se obter as imagens mais apropriadas para mensuração das variáveis empregadas no estudo. Em face da dispneia apresentada por alguns pacientes, especialmente animais com insuficiência cardíaca congestiva classe II, é possível que a movimentação passiva do coração dentro da caixa torácica possa ter interferido com o adequado posicionamento da linha do modo-M ou do cursor de interrogação do recurso *doppler*.

No tocante às variáveis estudadas, os parâmetros ecocardiográficos DIV_{ed} , $ESIV_s$ e $ESIV_d$ se mostraram alterados nos animais com DMVM, evidenciando mudança morfológica nos corações, tanto no fim da diástole quanto no final da sístole, comparativamente ao grupo controle. Essa condição retrata a hipertrofia ventricular esquerda desencadeada pela sobrecarga de volume e elevação da pós-carga, promovendo maior trabalho cardíaco e, conseqüentemente, hipertrofia excêntrica. Tais mudanças ocorreram em paralelo à classe funcional, corroborando os dados encontrados por Pedersen Häggström (2000) e Mucha (2001) onde encontraram remodelamentos nos cães acometidos por DMVM que possui ICC crônica. Da mesma forma, os resultados vão de encontro à descrição de Firm e Petric (2002), que relataram que as variáveis DIVE e ESIV podem ser indicadores prognósticos da evolução da cardiopatia.

A dimensão do AE e a relação AE/Ao também aumentaram de acordo com a classe funcional da insuficiência cardíaca congestiva em que os animais se encontravam, retratando a sobrecarga de volume e, possivelmente, o aumento da pressão de enchimento ventricular esquerdo, como já fora descrito por Borgenhagen et al (1977).

Embora não tenha sido evidenciada diferença estatística entre os grupos no tocante aos parâmetros $FEC\%$ e $FEJ\%$, é tácito seu incremento gradativo à medida que a enfermidade progride, de modo que os cães dos grupos controle e Ib apresentaram

valores dentro da faixa de variação para a espécie, ao passo que os animais do grupo II evidenciaram valores superiores, denotando a sobrecarga de volume e, por conseguinte, o princípio do mecanismo de Frank-Starling, como mencionado anteriormente por Kittleson (2006) e Boon (2011).

A avaliação dos resultados de $V_{\max}$ Pulm e FVI_{Ao} demonstrou diferenças do grupo GII comparativamente ao grupo controle, sugerindo a possibilidade de comprometimento da capacidade contrátil (BONAGURA et al., 1998). Ademais, considerando-se a estreita correlação entre FVI_{Ao} e o volume de ejeção em humanos e em cães (SABBAH et al., 1988), outra possibilidade para explicar esse fato reside na redução do volume de ejeção que, em contraste, normalmente está aumentado diante da ativação dos mecanismos compensatórios que acompanham a DMVM (KIENLE e THOMAS, 2004). Há ainda que considerar que os valores reduzidos desses parâmetros, mesmo no grupo de animais saudáveis, podem estar relacionados ao inadequado alinhamento do transdutor com o fluxo aórtico e pulmonar e ausência de correção matemática do ângulo (DARKE et al., 1993).

Ainda que a variável $V_{\max}E$ não tenha se mostrado diferente entre grupos, foi constatada diferença significativa em $V_{\max}A$ entre GC e Glb, sugerindo elevação da pré-carga e, naturalmente, maior participação do enchimento ventricular lento na composição do volume diastólico final (KIENLE & THOMAS, 2004). Esse achado ainda possibilita inferir sobre o aumento da pressão de enchimento ventricular e, consequentemente, sobre a presença de disfunção diastólica, ainda que em fase inicial (BOON, 2011). Por outro lado, o TRIV, um indicador de função diastólica, se comportou de maneira oposta, revelando maior comprometimento do relaxamento no grupo controle e ausência nos animais de GII. Esse fato possivelmente retrata erro de técnica no posicionamento do cursor *doppler*.

O TEVE, por sua vez, mostrou tendência de redução em paralelo à progressão da enfermidade, ainda que não tenha sido constatada diferença estatística entre grupos. Este achado pode ser atribuído à elevada ativação simpática que acompanha a síndrome insuficiência cardíaca congestiva, desencadeando redução dos intervalos de tempo sistólico (CAMACHO, 1996; MUCHA, 2001).

A avaliação por *doppler* tecidual revelou redução das variáveis E'_{sep} e E'_{lat} , bem como incremento de A'_{sep} e A'_{lat} nos animais de GII comparativamente aos cães de GC e Glb, possivelmente retratando a elevação da pressão de enchimento ventricular esquerda, em face da intensificação do quadro congestivo e, conseqüentemente, a menor participação do componente rápido no enchimento ventricular. A relação invertida entre as velocidades miocárdicas máximas no início da diástole ventricular e na sístole atrial remetem ao remodelamento cardíaco descrito por Bonagura (2009). Este, por sua vez, traz à tona a presença de disfunção diastólica nos animais com DMVM, bem como sua intensificação à medida que progride a síndrome insuficiência cardíaca congestiva. Por outro lado, a avaliação da onda S não mostrou diferença entre grupos, minimizando o suposto comprometimento contrátil aventado pelas alterações encontradas nos parâmetros V_{maxPulm} , V_{maxAo} e FVI_{Ao} , como já citado por Boon (2011)

Ao observar o comportamento das médias das relações calculadas entre $V_{\text{max}}E$ e E'_{lat} , bem como entre $V_{\text{max}}E$ e E'_{lat} , percebe-se nitidamente a elevação desses parâmetros à medida que a enfermidade se intensifica, em comparação aos valores registrados para os animais do grupo controle. Esses dados podem ser utilizados para estimar a pressão de enchimento, possibilitando a determinação do estado congestivo do paciente valendo-se de variáveis ecocardiográficas. Omnem (2000) e Schober (2008) relataram que essa condição supostamente decorre das modificações que acompanham a diástole ventricular, traduzindo-se como um pior prognóstico.

De maneira similar, as médias das relações entre E' e A' , tanto na avaliação junto ao ânulo mitral septal, quanto parietal, permaneceram inferiores a 1 nos cães do grupo GII, diferindo significativamente dos animais do grupo controle e caracterizando algum tipo de disfunção diastólica, como mencionando anteriormente por Oyama (2004).

A análise não paramétrica da concentração sérica de IL-1 β identificou diferença entre os cães saudáveis e aqueles portadores de DMVM e ICC classe Ib. Van Tassel (2012) demonstrou que a IL-1 β é um bom fator indicador de isquemia cardíaca em ratos com infarto agudo do miocárdio induzido experimentalmente. Ainda assim, os cães com DMVM e insuficiência cardíaca classe II apresentaram, curiosamente, mediana muito

semelhante à do grupo controle, embora alguns animais tenham demonstrado, individualmente, valores bastante superiores.

A observação das medianas de IL-4 em todos os grupos chama a atenção pela discrepância frente aos dados existentes em seres humanos. Ao estudar pacientes chagásicos, Rodrigues (2012) demonstrou boa correlação entre o aumento da concentração de IL-4 e a progressão da doença cardíaca, em face da estreita ligação dessa substância com o remodelamento e a fibrose miocárdica. Neste estudo não foi constatada diferença significativa entre grupos no tocante à concentração sérica de IL-4, mas é preciso salientar que todos os animais do grupo Glb e três cães do grupo GII apresentaram resultados inferiores à sensibilidade do kit (6,0 pg/mL), enquanto um animal incluso em GII também apresentou resultado superior ao último calibrador da curva (1000 pg/mL), resultando em medianas iguais a zero e, destarte, interferindo com a sensibilidade da análise estatística adotada.

O teste de correlação entre IL-1 β e os parâmetros ecodopplercardiográficos mostrou correlação positiva significativa com FEC% e FEJ%, contrariando aos achados de Van Tessel (2012) que evidenciou ação inotrópica negativa em ratos tratados com IL-1 β . É possível que essa divergência esteja relacionada ao fato de se tratar de um processo mais agudo, bem como à maior extensão da lesão no modelo experimental. Outro ponto que pode estar implicado diz respeito à sobrecarga de volume, o aumento da pós-carga presentes nos cães com DMVM, cuja repercussão sobre as variáveis FEC% e FEJ% são conhecidas (BOON, 2011), possibilitando que se mantenham estáveis (ou até mesmo se elevem) mesmo diante de comprometimento da função contrátil.

Por outro lado, foi constatada correlação negativa significativa entre a velocidade máxima da onda A do fluxo mitral e as concentrações séricas de IL-1 β e IL-4. Ainda que não tenha sido identificada diferença entre os grupos estudados, esse fato provavelmente reflete duas condições: o efeito prejudicial dessas substâncias sobre a atividade inotrópica atrial e/ou seu papel inflamatório sobre o tecido miocárdico ventricular, levando ao remodelamento, com restrição ao enchimento do ventrículo esquerdo (RODRIGUES, 2012; VAN TASSEL, 2012).

8. CONCLUSÕES

Após o desenvolvimento da metodologia proposta e análise dos resultados obtidos, foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

- 1) As concentrações séricas de IL-1 β e IL-4 não diverge em consonância à classe de ICC apresentada pelo animal, não permitindo a estratificação da severidade da DMVM.
- 2) A concentração sérica de IL-1 β nos animais com DMVM é inferior àquela apresentada por animais saudáveis;
- 3) Há correlação positiva entre a concentração de IL-1 β e as frações de encurtamento e ejeção, retratando a pré-carga que acompanha DMVM
- 4) A insuficiência cardíaca congestiva decorrente da DMVM desencadeia alterações morfológicas no coração;
- 5) Cães com DMVM e ICC classe II apresentam disfunção diastólica;
- 6) As concentrações séricas de IL-1 β e IL-4 não diverge em consonância à classe de ICC apresentada pelo animal, não permitindo a estratificação da severidade da DMVM.

9. REFERÊNCIAS¹

ABBOT, J. A. Doença valvar adquirida. In: TILLEY, L. P., GOODWIN, J. K. **Manual de cardiologia para cães e gatos**. 3ª ed, São Paulo: Roca, 2002, p. 119-24.

ANKER S.D.; NEGASSA, A.; COATS, A.J. et al. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. **Lancet**, v.361, p.1077-1083, 2003.

ANKER S.D.; STEINBORN, W.; STRASSBURG, S. Cardiac cachexia. **Ann Med**, v.36, n.7, p. 518-529, 2004.

ATKINS, C.E. Acquired valvular insufficiency. In MILLER, M.; TILLEY, L.P. (Ed.). **Manual of canine and feline cardiology**. 2ª Ed., Philadelphia: W. B. Saunders, 1995, p. 129-44.

ATKINS, C. Enalapril monotherapy in asymptomatic mitral regurgitation: results of the VetProof trial. In: **Proceedings of the 20th ACVIM Forum**, p. 75-76, 2002.

ATKINS, C. E. et al. Results of the veterinary enalapril trial to prove reduction in onset of heart failure in dogs chronically treated with enalapril alone for compensated, naturally occurring mitral valve insufficiency. **JAVMA**, v.231, n.7, p.1061-1069, 2007.

BEARDOW, A.W.; BUCHANAN, J.W. Chronic mitral valvedisease in Cavalier King Charles Spaniels: 95 cases (1987-1991). Journal **JAVMA**, v.203, n.7, p.1023-1029, 1993.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1997. 240p.

BITTAR, N.; SOSA, J.A. The billowing mitral valve leaflet: report on fourteen patients. **Circulation**, v.38, p.763-770, 1968.

BOON, J.A. **Manual of Veterinary Echocardiography**. 2.ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 2011.

BONAGURA, J.D.; MILLER, M.W.; DARKE, P.G.G. Doppler echocardiography I: pulsed-wave and continuous-wave examinations. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, Philadelphia, v.28, n6, p.1325-1359, 1998.

BONAGURA JD, SCHOBBER KE. Can ventricular function be assessed by echocardiography in chronic canine mitral valve disease. **J Small Anim Pract.**, v.50, p.12-24, 2009.

BORGARELLI, M; ZINI, E.; D'AGNOLO, G. et al. Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. **J Vet Cardiol**, n.6, p.25-31, 2004.

BORGENHAGEN, D.M.; SERUR, J.R.; GORLIN, R. et al. The effects of left ventricular load and contractility on mitral regurgitant orifice size and flow in the dog. **Circulation**, v.56, n.1, p.106-113, 1977.

BOSWOOD, A. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides, **J Vet Cardiol**, n.11, v.3, p.1-10, 2009.

BUCHANAN, J.W. Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs. **Adv Vet Sci**, v.21, p.75-106, 1977.

BUCHANAN, J.W.; BÜCHELER, J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. **JAVMA**, v.206, n.2, p.194-199, 1995.

CAMACHO, A.A. Estudo clínico, caracterização morfológica e quantitativa dos neurônios ganglionares atriais da faixa intercaval de cães com miocardiopatia dilatada.congestiva idiopática.1996. 56f. Tese (livre Docência)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

DAVIES, M.J.; MOORE, B.P.; BAIMBRIDGE, M.V. The floppy mitral valve. Study of incidence, pathology, and complications in surgical, necropsy, and forensic material. **British Heart Journal**. v. 40, p. 468-481, 1978.

DARKE, P.G.G.; BONAGURA, J.D.; MILLER, M. Transducer orientation for Doppler echocardiography in dogs. **J Small Anim Pract**, v.34, p.2-8, 1993.

DUTKA, D.P.; ELBORN, J.S.; DELAMERE, F. et al. Tumour necrosis factor alpha in severe congestive cardiac failure. **Br Heart J**, v.70, n.2, p.141–143, 1993.

ESTHER Jr, C.R.; MARINO, E.M.; BERNSTEIN, K.E. The role of angiotensin-converting enzyme in blood pressure control, renal function and male fertility. **Trends in Endocr Metabol**, v.8, n.5, p.181-186,1997.

ETTINGER, S.J. Enfermedades de las válvulas cardíacas. *In* ETTINGER, S.J. (ED.) **Tratado de Medicina Interna Veterinaria** Ed. Intermédica. Buenos Aires. p. 1092-1112, 1992.

FILIPPATOS, G.S.; KANATSELOS, C.; MANOLATOS, D.D.; et al. Studies on apoptosis and fibrosis in skeletal musculature: a comparison of heart failure patients with and without cardiac cachexia. **Int J Cardiol**, v.90, n.1, p.107-113, 2003.

FIRM, I., PETRIC, A. D. Epidemiological study of myxomatous valvular disease – A

retrospective study of 195 cases. 2002. Disponível em www.vin.com/proceedings/proceedings.plx/cid=WSAVA 2002. Acesso em 23 de outubro de 2007.

FREEMAN, L.M.; RUSH, J.E. Cardiovascular diseases: nutritional modulation. In: PIBOT, P.; BIOURGE, V.; ELLIOT, D. **Encyclopedia of Canine Clinical Nutrition**, Aniwa SAS, 2006, p.316-341.

HÄGGSTRÖM, J.; HANSSON, K.; KVART, C. et al. Chronic valvular disease in the Cavalier King Charles Spaniel in Sweden. **Vet Rec**, v.12, p.549-553, 1992.

HÄGGSTRÖM, J.; KVART, C.; HANSON, K. Heart sounds and murmurs: changes related to severity of chronic valvular disease in the Cavalier King Charles Spaniel. **J Vet Intern Med**, v.9, n.2, p.75-85, 1995.

HÄGGSTRÖM, J.; HANSSON, K.; KVART, C. et al. Effects of naturally acquired decompensated mitral valve regurgitation on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic peptide concentration in dogs. **Am J Vet Res**, v.58, n.1, p.77-82, 1997.

HÄGGSTRÖM, J. Update on chronic valvular disease in dogs. **Abstracts of WSAVA/FECAVA World congress**, p.38-39, 2000.

HAMLIN, R. L., BENITZ, A. M., ERICSSON, G. F., CIFELLI, S., DAURIO, C. P. Effects of enalapril on exercise tolerance and longevity in dogs with heart failure produced by iatrogenic mitral regurgitation. **Journal Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia. v.2, n. 10, p. 85-7, 1996.

HAMLIN, R.L.; BENITZ, A.M.; ERICSSON, G.F. et al. Effects of enalapril on exercise tolerance and longevity in dogs with heart failure produced by iatrogenic mitral regurgitation. **J Vet Intern Med**, v.10, n.10, p.85-87, 1996.

HELLWIG, C.A. Atheromatosis of the mitral valve. **Am Heart J**, v.57, p.41-49, 1942.

International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC). Recommendations for the diagnosis of heart disease and the treatment of heart failure in small animals. In.: MILLER, M.S.; TILLEY, L.P. Manual of canine and feline cardiology. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995, p.150.

KENNE, B.W.; RUSH, J.E. Terapia da insuficiência cardíaca. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. Tratado de medicina interna veterinária. São Paulo: Manole, 1997, p. 1219-1253.

KEENE, B.W. Dilated cardiomyopathy in dogs: diagnosis and long term management. In: **18th Waltham/OSU Symposium**, 1994, p.27-32.

KERN, W.H; TUCKER, B.L. Mixoid changes in cardiac valves: pathological, clinical and ultrastructural studies. **Am Heart J**, v.84, n.3, p.294-301, 1972.

KIENLE, R.D.; THOMAS, W.P. Ecocardiografia. In: NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. **Ultra-som diagnóstico em pequenos animais**. 2 ed, São Paulo: Roca, 2004, p.368-438.

KITAGAWA, H.; WAKAMIYA, H.; KITO, K. et al. Efficacy of monotherapy with benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, in dogs with naturally acquired chronic mitral insufficiency. **J Vet Med Sci**, v.59, p.513-520, 1997.

LEVINE, B.; KALMAN, J., MAYER, L. et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **N Engl J Med**, v.323, n.4, p.236-341, 1990.

MC CARTHY, L.J.; WOLF, P.L. Muroid degeneration of the heart. "Blue valve syndrome". **American Journal of Cardiac Pathology**. v.54, p. 852-856, 1970.

MOÏSE, N.S. Echocardiography. In.: FOX, P.R. Canine and feline cardiology. New York: Churchill Livingstone, 1988,p.113-156.

MOW, T.; PEDERSEN, H.D. Increased endothelin receptor density in myxomatous canine mitral valve leaflets. **J Cardiovasc Pharmacol**, n.34, p.254-260, 1999.

MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. Determinação da pressão arterial. In: BELERENIAN, G.C.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. Afecções cardiovasculares em pequenos animais. São Caetano do Sul: Interbook, 2003, p.68-71.

MUCHA, C.J. Insuficiencia valvular mitral: endocardiosis mitral. In: BELERENIAN, G.C.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. Afecciones cardiovasculares en pequeños animales. Buenos Aires: Intermedica, 2001, p.155-152.

ORAL, H.; KAPADIA, S.; NAKANO, M. et al. Tumor necrosis factor alpha and the failing human heart. **Clin Cardiol**, v.18 (suplem. IV), p.IV20-IV27, 1995.

PEDERSEN, H.D.; HÄGGSTRÖM J. Mitral valve prolapse in the dog: a model of mitral valve prolapse in man. **Cardiovas Res**, v.47, p.234-243, 2000.

PEDERSEN, H. Effects of mild mitral valve insufficiency, sodium intake and place of blood sampling on the renin-angiotensin system in dogs. **Acta Vet Scand**, v.37, p.109-118, 1996.

POCOCK, W.A. Mitral leaflet bowing and prolapsed. *In* BARLOW, J. (Ed.) **Perspectives in The Mitral Valve**. Ed. E.A. Davis. Philadelphia. p. 45-112, 1987.

POMERANCE, A. Pathogenesis of "senile" nodular sclerosis of atrio-ventricular valves. **Br Heart J**, v.28, p.815-823, 1966.

POMERANCE, A. Balloning deformity (mucoid degeneration) of atrioventricular valves. **Br Heart J**, v.31, p.343-351, 1969.

POMERANCE, A. Pathology and valvular heart disease. **Br Heart J**, v.34, p.437-443, 1972.

POMERANCE, A.; WIHTNEY, J.C. Heart valve changes common to man and dog: a comparative study. **Cardiovasc Res**, v.4, p.61-66, 1970.

RAO, P.V. **Statistical research methods in life sciences**. Pacific Groove: Duscbury Press, 1998, 889p.

Rodrigues, D B R. *InSitu* Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells inChagas' Disease Patients with Heart Failure. *Clinical and Developmental Immunology* p. 7. doi:10.1155/2012/361730

RUSH, J.; FREEMAN, L. Sistema cardiovascular. In: GOLDSTON, R.; HOSKINS, J. Geriatria y gerontologia del perro y del gato. Buenos Aires: Intermédica, 1997, cap. 5, p. 103-132.

SHAH, P.V. Echocardiography in congestive or dilated cardiomyopathy. **J Am Soc Echocardiogr**, v.1, p.20-30, 1998.

- SKIDGEL, R. A. et al. Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. **Peptides**, Fayetteville. n. 5, p. 769-776, 1984
- SOFFER, R.L. Angiotensin-converting enzyme and the regulation vasoactive peptides. **Ann Rev Bioch.** v.45. p.73-94, 1976.
- SONNENBLICK, E.H.; DAGGET, W.M.; COOPER, T. Active contraction of the mitral valve: intrinsic neuromuscular basis for valvular motion. **Circulation**, v.34 (supl.III), p. III-221, 1966.
- TILLEY, L.P. Interpretations of Q, R, S, T deflections. In: TILLEY, L.P. **Essentials of canine and feline eletrocardiography**. 3 ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1992, p.59-99.
- VAN TASSEL I BW, ARENA RA, TOLDO S, MEZZAROMA E, AZAM T, et al. (2012) Enhanced Interleukin-1 Activity Contributes to Exercise Intolerance in Patients with Systolic Heart Failure. **PLoS ONE** 7(3): e33438. doi:10.1371/journal.pone.0033438
- WARE, W.A. Enfermedades valvulares y endocárdicas adquiridas. In NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina interna de animales pequeños. 2 ed., Buenos Aires: Intermédica, cap. 8, p.144-157, 2000.
- WHITNEY, J.C. Observations on the effect of age on the severity of heart valve lesions in the dog. **J Small Anim Pract.** v.15, p.511, 1974.