

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**Scienze Mediche Generali e dei Servizi
Tematica di Ricerca: Ultrasonologia Veterinaria**

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4

Settore Scientifico Disciplinare: Clinica Medica Veterinaria VET/08

**ASPETTI ULTRASONOGRAFICI
IN CORSO DI SVILUPPO PLACENTARE
E ADATTAMENTO CARDIOVASCOLARE
NELLA CAVALLA GRAVIDA:
Ecografia bidimensionale, Ecocardiografia
ed Ecocontrastografia (CEUS)**

Presentata da: dott.ssa Francesca Freccero

Coordinatore Dottorato

Relatore

Rizzo prof. Nicola

Cipone prof. Mario

Esame finale anno 2014

**ASPETTI ULTRASONOGRAFICI
IN CORSO DI SVILUPPO PLACENTARE
E ADATTAMENTO CARDIOVASCOLARE
NELLA CAVALLA GRAVIDA:
Ecografia bidimensionale, Ecocardiografia ed
Ecocontrastografia (CEUS)**

INTRODUZIONE	1
PROGETTO 1 - VALUTAZIONE ECOCONTRASTOGRAFICA (CEUS) ED ECODOPPLER DELLA VASCOLARIZZAZIONE UTERO-PLACENTARE IN CORSO DI GRAVIDANZA NORMALE NELLA CAVALLA	5
CAPITOLO 1 – REVISIONE DELLA LETTERATURA	
1.1. VALUTAZIONE ECOCONTRASTOGRAFICA DELLA PERFUSIONE UTERO-PLACENTARE	6
1.2. LA PLACENTA EQUINA	10
1.2.1 Placentazione.....	11
1.2.2 Vascolarizzazione della placenta.....	14
1.3. MONITORAGGIO ECOGRAFICO DELL'UNITA' FETO-PLACENTARE NELLA FATTRICE	19
1.3.1 Ecografia bidimensionale.....	19
1.3.1.1 Ecografia transrettale.....	20
1.3.1.2 Ecografia transaddominale.....	21
1.3.2 Esame Doppler del flusso uterino.....	27
1.4 ESAME ECOGRAFICO CON MEZZO DI CONTRASTO: PRINCIPI ED APPLICAZIONI	29
CAPITOLO 2 – PARTE SPERIMENTALE PROSPETTICA	32
2.1 MATERIALI E METODI	33
2.1.1 Animali.....	33
2.1.2 Protocollo di studio ecografico.....	34
2.1.2.1 Esame clinico.....	35
2.1.2.2 Esame ecografico.....	35
2.1.2.3 Esame ecografico bidimensionale.....	36
2.1.2.3.1 Spessore combinato di utero e placenta (SCUP).....	37
2.1.2.3.2 Frequenza cardiaca fetale.....	38
2.1.2.4 Esame ecografico con mezzo di contrasto.....	39
2.1.2.5 Esame bidimensionale e Doppler delle arterie uterine.....	42
2.2 RISULTATI	45
2.2.1 Rilievi ecografici bidimensionali.....	45
2.2.1.1 Spessore combinato di utero e placenta (SCUP).....	46
2.2.1.2 Frequenza cardiaca fetale.....	49
2.2.2 Rilievi ecocontrastografici (CEUS).....	50
2.2.2.1 Valutazione qualitativa dei filmati CEUS.....	50
2.2.2.2 Valutazione quantitativa dei filmati CEUS.....	53
2.2.2.3 Frequenza cardiaca e respiratoria materna.....	56
2.2.3 Rilievi bidimensionali e Doppler delle arterie uterine.....	57
2.3 DISCUSSIONE	61
BIBLIOGRAFIA.....	72

PROGETTO 2 - VALUTAZIONE ECOCARDIOGRAFICA LONGITUDINALE IN CORSO DI GRAVIDANZA NORMALE NELLA CAVALLA	81
CAPITOLO 1 – REVISIONE DELLA LETTERATURA	
1.1 VALUTAZIONE ECOCARDIOGRAFICA IN CORSO DI GRAVIDANZA	82
1.2 L'ESAME ECOCARDIOGRAFICO NEL CAVALLO	87
1.2.1 Tecnica d'esame e preparazione del paziente	87
1.2.2 Finestre acustiche, immagini e scansioni cardiache	88
1.2.2.1 Immagini dell'emitorace di destra	89
1.2.2.2 Immagini dell'emitorace di sinistra	91
1.2.3 Valutazione 2D, M-mode, Doppler e TDI delle dimensioni cardiache e degli indici di funzionalità cardiaca	92
1.2.3.1 Misurazioni ed indici del ventricolo sinistro in M-mode	93
1.2.3.2 Misurazioni ed indici del ventricolo sinistro in 2D	96
1.2.3.3 Misurazioni ed indici del ventricolo sinistro con Doppler	97
1.2.3.4 Valutazione dell' <i>output</i> cardiaco	98
1.2.3.5 Valutazione della funzione del ventricolo sinistro con TDI	99
1.2.3.5.1 Valutazione della funzione radiale sistolica del VS	100
1.2.3.5.2 Valutazione della funzione radiale diastolica del VS	101
1.2.3.5.3 Valutazione della funzione atriale sinistra	102
1.2.3.6 Valutazione dell'atrio sinistro	103
CAPITOLO 2 - PARTE SPERIMENTALE PROSPETTICA	104
2.1 MATERIALI E METODI	105
2.1.1 Animali	105
2.1.2 Studio ecocardiografico	105
2.1.2.1 Acquisizione delle immagini ecocardiografiche	106
2.1.2.2 Misurazioni e calcoli ecocardiografici	109
2.1.2.2.1 Misurazioni e calcoli della funzione del VS in M-mode	110
2.1.2.2.2 Misurazioni e calcoli della funzione del VS in 2D	111
2.1.2.2.3 Misurazioni e calcoli della funzione del VS in Doppler	112
2.1.2.2.4 Misurazioni e calcoli della funzione del VS in TDI	112
2.1.2.2.5 Misurazioni delle dimensioni dell'AS in 2D	114
2.1.2.2.6 Misurazioni del flusso polmonare e tricuspidalico	114
2.2 RISULTATI	115
2.2.1 Frequenza cardiaca	115
2.2.2 Variabili M-mode	116
2.2.3 Variabili 2D	118
2.2.4 Variabili Doppler	124
2.2.5 Variabili TDI	125
2.3 DISCUSSIONE	130
TAVOLA I DELLE FIGURE	140
TAVOLA II DELLE FIGURE	145
BIBLIOGRAFIA	151

INTRODUZIONE

La gravidanza nella specie equina ha una durata fisiologica variabile, compresa indicativamente tra 320 e 365 giorni e generalmente porta a termine lo sviluppo di un unico feto (LeBlanc MM., 1993).

Nella cavalla la maggior parte delle gravidanze sono portate a termine, con la nascita di un puledro sano e senza complicanze per la fattrice, ma una piccola percentuale delle gravidanze esitano in stati patologici o nella morte per il neonato od in disturbi materni. Queste gravidanze a rischio spesso non mostrano segni premonitori prima della manifestazione patologica e costituiscono un problema diagnostico e terapeutico per il clinico.

La gestione routinaria delle fattrici dal punto di vista riproduttivo prevede la maggior parte del monitoraggio clinico-diagnostico della gravidanza concentrato nelle prime fasi, per cui molti esami ecografici sono eseguiti ai fini della manipolazione del ciclo estrale, dell'accertamento di gravidanza dell'impianto e dello sviluppo dell'embrione. Dopo i primi 45-60 giorni, la fattrice solitamente non riceve più un monitoraggio stretto fino alle ultime 4-8 settimane di gestazione. Di conseguenza molte cause di aborto, malattia fetale/neonatale o mortalità negli ultimi due terzi di gravidanza rimangono poco indagate (Santschi E. e Vaala WE., 2011).

Le patologie placentari, implicando un'interferenza a carico del trasporto di ossigeno e nutrienti o della rimozione di cataboliti a livello dell'unità utero-placentare, sono la principale causa di aborto o di compromissione del benessere del feto. La maggior parte dei disturbi placentari pongono un basso rischio di patologia per la madre ma elevato per il feto, risultando quindi spesso difficili da diagnosticare clinicamente

con tempestività, fattore fondamentale per l'esito favorevole dell'intervento terapeutico (Giles RC. et al., 1993).

Le fattrici sono in grado di produrre puledri vitali fino ad età avanzata; tuttavia, c'è un fisiologico declino nella fertilità e nella capacità di portare a termine la gravidanza con l'avanzare dell'età, cui possono contribuire numerosi fattori fisio-patologici. Alcuni fattori potrebbero portare ad uno sviluppo placentare inadeguato ed è stato ipotizzato che lo scarso sviluppo placentare sia associato ad un compromesso flusso ematico utero-placentare, che limiterebbe la crescita del feto (Ousey JC. et al., 2012).

La gravidanza normale impone fisiologicamente profondi cambiamenti a livello del sistema cardio-vascolare in un periodo di tempo relativamente breve, necessari per far fronte alle crescenti esigenze nutritive dell'unità feto-placentare in rapida crescita (Cornette J. e Roos-Hesselink JW., 2014).

Nella donna, un inadeguato adattamento cardio-vascolare materno è correlato con decorso ed esito patologici della gravidanza e condizioni quali pre-eclampsia, restrizione della crescita intrauterina, distacco placentare e natimortalità (Vasapollo B. et al., 2008).

L'adattamento cardio-vascolare materno durante la gravidanza gioca un ruolo fondamentale nella perfusione uterina, che deve garantire l'appropriato apporto per lo sviluppo del feto. Nella donna, ci sono evidenze che gravidanze complicate da restrizione della crescita intrauterina siano associate a deficit nell'espansione dello spazio intravascolare materno e nel fisiologico aumento dell'output cardiaco (Kametas NA. et al., 2001).

Lo studio dell'adattamento cardio-vascolare materno in gravidanza fornisce informazioni sull'interazione tra l'omeostasi materna e fetale e può rivelarsi un utile strumento di screening verso le complicanze in corso di gestazione (Blanco PG. et al., 2011).

In letteratura ci sono informazioni limitate sulla funzione cardiovascolare in corso di gravidanza normale nella fattrice. Ad oggi, nella cavalla, le modificazioni emodinamiche materne durante la gestazione sono state descritte a livello periferico, attraverso lo studio del flusso ematico uterino tramite l'esame Doppler a livello delle arterie uterine.

Durante la prima metà della gravidanza equina le caratteristiche flussimetriche dell'utero gravido si trasformano, passando da una circolazione ad elevata resistenza e bassi flussi ad una a bassa resistenza ed alti flussi ed il *timing* di questa transizione è correlato strettamente l'angiogenesi placentare.

Durante la seconda metà della gravidanza, la resistenza vascolare dei tessuti utero-placentari si modifica poco (Ousey JC. et al., 2012). Per contro, il volume del flusso ematico a livello di arterie uterine continua ad aumentare per tutta la durata della gravidanza. L'aumento dell'apporto ematico ai tessuti utero-placentari è influenzato da vari fattori oltre all'impedenza vascolare, che includono modificazioni nella circolazione placentare e fetale (Samuel CA. et al., 1975; Fowden AL. et al., 2000; Abd-Elnaeim M. et al., 2006). Dal lato materno della placenta, avverrebbe una redistribuzione del flusso ematico dagli altri tessuti verso l'utero gravido ed un aumento dell'*output* cardiaco attraverso l'aumento della frequenza cardiaca e dello *stroke* volume; da studi in medicina umana, oltre il 20% dell'*output* materno sarebbe redistribuito verso l'utero gravido rispetto a circa lo 0,5% di volume ricevuto quando non gravido (Ousey JC. et al., 2012). La tendenza ad avere velocità di flusso uterino più basse nelle fattrici anziane sarebbe in parte spiegata dal declino della funzione cardiovascolare con l'età (Betros CL. et al., 2002).

Durante le ultime fasi della gestazione (dal giorno 210 a termine) il

flusso ematico totale aumenta di circa 3 volte. Questo aumento accompagna l'incremento di 3-4 volte del peso corporeo del feto che avverrebbe nello stesso periodo. (Ousey JC. et al., 2012). Quindi il volume totale di flusso ematico a livello uterino aumenta in proporzione alla crescita fetale (Fowden AL. et al., 2000), come descritto anche nella pecora, nella bovina e nella donna. Inoltre, sembra esserci una tendenza ad avere flussi ematici uterini di maggior entità nelle fattrici giovani rispetto alle anziane, i cui puledri pesano proporzionalmente di meno e questo sarebbe indicativo di un limitato apporto nutritivo al feto in queste ultime (Ousey JC. et al., 2012).

Nel complesso, gli adattamenti circolatori materni sono importanti tanto a livello cardiaco quanto a livello periferico di vascolarizzazione utero- placentare, al fine di favorire l'aumento del flusso ematico sia verso che nei tessuti feto-placentari e quindi di garantire l'adeguato apporto nutritivo necessario alla crescita ed al benessere del feto (Ousey JC. et al., 2012).

Sulla base di tali presupposti ed in considerazione delle poche informazioni disponibili in letteratura relative alle modificazioni emodinamiche che avvengono nel corso della gravidanza nella fattrice, con questo studio prospettico ci si è proposti di indagare tali modificazioni a livello centrale, tramite valutazione ecocardiografica dei parametri morfo-funzionali cardiaci ed a livello periferico, tramite l'applicazione, per la prima volta nella specie equina, dell'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) per la valutazione della perfusione utero-placentare.

PROGETTO 1

VALUTAZIONE ECOCONTRASTOGRAFICA (CEUS) ED ECODOPPLER DELLA VASCOLARIZZAZIONE UTERO-PLACENTARE IN CORSO DI GRAVIDANZA NORMALE NELLA CAVALLA

CAPITOLO 1 - REVISIONE DELLA LETTERATURA

1.1 VALUTAZIONE ECOCONTRASTOGRAFICA DELLA PERFUSIONE UTERO-PLACENTARE

La placenta rappresenta la superficie di scambio di gas respiratori, nutrienti e cataboliti tra la madre ed il feto. Gli scambi trans-placentari dipendono primariamente dall'entità del flusso ematico materno e fetale.

Nella fattrice, le patologie placentari rappresentano la causa della maggior parte delle condizioni di aborto o compromissione fetale, implicando un'interferenza con tali scambi.

E' stato ipotizzato che uno scarso sviluppo placentare sia associato ad un compromesso flusso ematico utero-placentare, che inficierebbe la crescita del feto (Ousey JC. et al., 2012). I feti possono essere abortiti o nascere piccoli, sottopeso o dismaturi (mantello sottile, sistema muscolo-scheletrico debole, apparato cardiovascolare e gastrointestinale immaturi) o con problemi di vario grado legati alla carenza di nutrimento. Inoltre, le fattrici tendono a partorire puledri dismaturi ripetutamente.

L'insufficienza placentare è un disturbo tuttora poco definito e spesso rappresenta una diagnosi istologica per esclusione. Il risultato è un inadeguato nutrimento del feto e la causa è ritenuta essere una compromissione dell'endometrio che non consente un adeguato scambio od attacco con la placenta; ciò comporta lo sviluppo di una placenta piccola e "povera" (avillosa) (Santshi A. e Vaala WE., 2011) .

Oltre che in condizioni patologiche, c'è un fisiologico declino nella fertilità e nella capacità di portare a termine la gravidanza con l'età, cui possono contribuire numerosi fattori fisio-patologici che potrebbero esitare in uno sviluppo placentare inadeguato (Ousey JC. et al., 2012).

La densità di superficie microcotiledonaria fornisce una stima della vascolarizzazione dei villi di pertinenza fetale, ove valori bassi indicano una minor capacità di scambio di gas e nutrienti. Alcuni Autori hanno riscontrato istologicamente una densità di superficie microcotiledonaria più bassa nelle fattrici anziane (Ousey JC. et al., 2012). Altri Autori hanno inoltre dimostrato una densità ridotta della superficie microcotiledonaria con microvilli più corti ed in minor numero in fattrici anziane con endometriosi, associata ad una sostanziale riduzione del peso del feto (Bracher V. et al., 1996; Wilsher S. e Allen WS., 2003).

Ad oggi, nella cavalla, le modificazioni emodinamiche materne durante la gravidanza sono state descritte a livello periferico, attraverso lo studio del flusso ematico uterino tramite l'esame Doppler delle arterie uterine (Bollwein H. et al., 2003; Bollwein H. et al., 2004; Ousey JC., 2012).

I parametri Doppler, misurati a livello delle arterie uterine, sono stati ampiamente proposti quali parametri direttamente legati alla perfusione vascolare dei tessuti utero-placentari e correlati con la crescita fetale e placentare (Abramowicz JS. e Sheiner E., 2008).

Complessivamente, i cambiamenti emodinamici a livello di arterie uterine consistono in una transizione da un sistema ad alta resistenza e bassi flussi ad uno a bassa resistenza ed alti flussi all'avanzare dell'età gestazionale ed il *timing* di questo cambiamento è correlato con l'angiogenesi placentare e con l'esponenziale crescita fetale rispettivamente durante le prime e le ultime fasi della gravidanza (Ousey JK. et al., 2012).

Tuttavia, gli indici derivati dall'analisi Doppler sono parametri indiretti di sviluppo vascolare utero-placentare; nella donna, essi non sono correlati in maniera affidabile ai disturbi clinici associati ad una ridotta

perfusione utero-placentare ed hanno valore predittivo controverso in condizioni quali pre-eclampsia, restrizione della crescita intra-uterina e morte perinatale. Pertanto, la possibilità di quantificare in maniera oggettiva e non invasiva la micro-perfusione utero-placentare potrebbe fornire informazioni utili relative alla funzionalità placentare (Zhou YJ. et al., 2013).

L'utilizzo della CEUS (Contrast-enhanced ultrasonography) anche in ostetricia, offre una nuova opportunità di valutare la circolazione utero-placentare e quantificare alcuni parametri emodinamici del flusso uterino nel corso della gravidanza.

Dalla fine degli anni '90 sono riportati studi relativi all'uso dei mezzi di contrasto ecografici per la valutazione della perfusione placentare nella donna, nei primati e nel ratto. Inizialmente le microbolle venivano utilizzate per migliorare il segnale Doppler nel rilevare la microvascolarizzazione e la capacità di differenziazione tra diverse aree e tra la porzione materna e fetale del circolo placentare (Orden MR et al., 1999; Schmiedl UP. et al., 1999); grazie allo sviluppo delle tecnologie di acquisizione ed analisi dell'immagine ecocontrastografica (Ragavendra N. e Tarantal A., 2001; Barth WH. et al., 2006), ad oggi la CEUS permette di ottenere una stima accurata del volume microvascolare e delle velocità di flusso, derivata dall'analisi dei dati intensità-tempo, fornendo quindi valutazioni quantitative con elevata risoluzione spaziale e temporale della perfusione utero-placentare (Arthuis CJ. et al., 2013; Zhou YJ. et al., 2013). Inoltre, l'esame con mezzo di contrasto permette di rilevare le modificazioni della perfusione uterina in maniera più sensibile e più precoce rispetto all'esame Doppler (Keator CS. et al., 2011). Recentemente il Sonovue®, uno dei mezzi di contrasto di II generazione maggiormente utilizzati in medicina umana e veterinaria, è stato impiegato con successo in un caso di placenta

previa nella donna ed in uno studio sulla preeclampsia nel ratto (Poret-Bazin H. et al., 2013; Yan T. et al., 2013).

Diversi studi hanno dimostrato che i mezzi di contrasto, grazie alle caratteristiche fisiche rimangono puramente intravascolari, non passano la barriera placentare (Arthuis CJ. et al., 2013), non ne alterano la permeabilità alle macromolecole (Hua X. et al., 2009) e non ne provocano alterazioni riscontrabili istologicamente, inoltre non vengono rilevati a livello di feto e strutture fetali né provocano alterazioni nei parametri vitali ed emodinamici fetali e materni (Orden MR. et al., 1999; Orden MR. et al., 2000; Ragavendra N. e Tarantal A., 2001).

Quindi, sebbene nella donna l'applicazione clinica in corso di gravidanza non sia ancora stata approvata, numerosi dati suggerirebbero la bio-sicurezza dell'utilizzo dei mezzi di contrasto per la madre e per il feto.

1.2 LA PLACENTA EQUINA

La placenta equina è definita come adeciduata, diffusa, microcotiledonaria ed epiteliochoriale, con riferimento rispettivamente al grado di preservazione del tessuto materno all'espulsione, alla forma ed estensione dell'apposizione tra l'allantocorion e l'endometrio, che interessa tutta la superficie eccetto la parte craniale del corno uterino e la cervice, al sistema di attacco della placenta ed al grado di invasività dei tessuti fetali.

Specificamente, il microplacentoma è costituito dalla caruncola materna e dal cotiledone fetale, che è un'estensione dei villi dell'allantocorion; tra questi sono presenti degli spazi o areolae, dove le ghiandole uterine rilasciano le secrezioni, fornendo il substrato per un nutrimento anche di tipo istiotrofico del feto. Tutti e tre gli strati tissutali fetali (endotelio vascolare, connettivo mesodermico ed ectoderma corionico) permangono così come i corrispondenti strati materni, risultando nell'apposizione tra l'epitelio corionico fetale e l'epitelio endometriale (Morresey PR., 2011).

Formazione delle coppe endometriali

Si accenna brevemente alle coppe endometriali, strutture caratteristiche della placenta equina secernenti *equine chorionic gonadotropin* (eCG), un ormone fortemente stimolante l'attività ovarica.

Le coppe endometriali si sviluppano da un'interazione di cellule di origine materna e fetale a circa 36 giorni. A causa dell'origine cellulare mista, le coppe endometriali sono dotate di proprietà immunologiche. Esse cominciano ad attrarre molti linfociti ed intorno agli 80 giorni di gestazione cominciano a degenerare. Il ruolo dell'elevata quantità di eCG secreto dalle coppe sembra essere quello di stimolare il corpo luteo primario a produrre

gli ormoni necessari al mantenimento della gravidanza finchè la secrezione feto-placentare non diventa adeguata (Ginther JO., 1998).

1.2.1 Placentazione

L'embrione prima dell'impianto si nutre del c.d. "latte uterino" o istiotrofo, secreto dalle ghiandole uterine sotto lo stimolo del progesterone.

Dal 17° giorno di gestazione il *conceptus*, ancora sferico, rimane fermo alla base di un corno uterino grazie all'aumento della tonicità del miometrio.

Fino al 40° giorno dall'ovulazione, il trofoblasto non invasivo dell'allantocorion giace in semplice apposizione ma non intimamente associato con l'epitelio luminale dell'endometrio (Ginther OJ., 1998); da questo periodo in avanti cominciano a svilupparsi dei microvilli e l'adesione tra lo strato epiteliale materno e fetale ed ha inizio la placentazione allantocoriale (Samuel CA. et al., 1974).

Superficie fetale

A partire dal 40° giorno della gestazione la maggior parte della superficie della membrana allantocoriale è coperta da rudimentali villi primari, cui corrispondono le cripte materne (Macdonald AA. et al., 2000).

Progressivamente, i villi primari sviluppano delle ramificazioni secondarie e, in seguito, ha luogo una coalescenza di parecchi villi adiacenti che condividono una stessa "radice". A circa 150 giorni si forma definitivamente la placenta microcotiledonare su tutta la superficie dell'endometrio (Rossdale PD., 2005). Nel periodo intorno ai 180-200 giorni, a livello di ogni microcotiledone sono riconoscibili villi primari, secondari e terminali, strettamente aderenti alle corrispondenti cripte materne. I microcotiledoni aumentano poi progressivamente in altezza e

mostrano più ramificazioni mentre i villi si riuniscono in densi gruppi microcotiledonari a termine della gestazione (**Fig.1.2.1**) (Abd-Elnaeim M. et al., 2006)

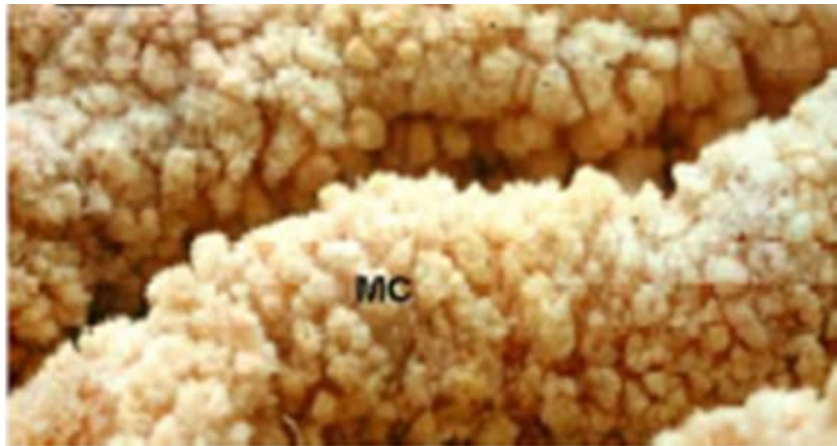


Figura 1.2.1 Immagine al microscopio dei microcotiledoni (MC) (da Wilsher e Allen, 2009).

I microvilli corionici sono strutture altamente vascolari che progressivamente si interdigitano sempre più con le pliche riccamente vascolarizzate della superficie endometriale. La loro funzione è avvicinare i vasi fetali a quelli materni al fine di sostenere il nutrimento del feto fino al termine approssimativo di 340 giorni di gestazione (Allen WR. e Wilsher S., 2009).

Superficie materna

La formazione delle microcaruncole ha luogo tra i 100 e 150 giorni circa di gestazione (Samuel CA. et al., 1974). L'endometrio uterino a 105 giorni di gravidanza appare indentato con molte cripte singole normalmente strutturate come filari irregolari. La densità delle cripte si aggira intorno a 100/mm².

Le cripte endometriali progressivamente allargano le loro aperture,

divengono più profonde e ramificate nello spessore dell'endometrio e si riuniscono in *clusters*. Questi gruppi di cripte rappresentano delle piccole microcaruncole (**Fig. 1.2.2**), che sono presenti a una densità di circa 1-2/mm² intorno ai 165 giorni. Il tessuto epiteliale materno ha un aspetto sottile in confronto al diametro relativamente ampio delle cripte tortuose e irregolarmente ramificate (**Fig. 1.2.3**) (Macdonald AA. et al., 2000).

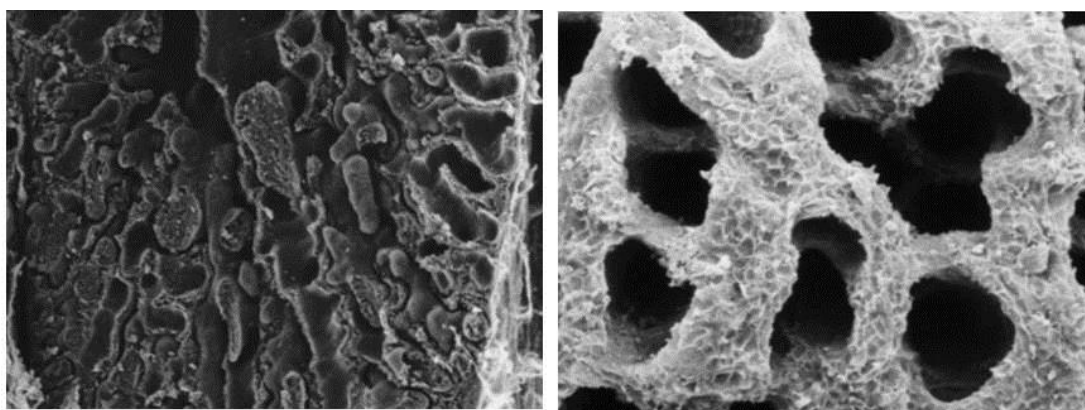


Figura 1.2.2 Immagine al microscopio elettronico di una microcaruncola (a sinistra).

Figura 1.2.3 Immagine al microscopio elettronico delle cripte endometriali (a destra) (da Macdonald et al., 2000).

Con l'avanzare della gestazione si assiste ad un aumento nella profondità delle microcaruncole, ovvero delle ramificazioni endometriali che sboccano nelle cripte, fino a circa 1mm nello spessore dell'endometrio; inoltre aumenta il numero di cripte primarie che si aprono alla base della microcaruncola stessa, incapsulate in una guaina di tessuto connettivo sottile.

Le microcaruncole appaiono strettamente raggruppate tra loro ma separate alla base e ad una densità di circa 1-2/mm² intorno ai 310-340 giorni di gravidanza (Macdonald AA. et al., 2000).

Il microcotiledone, di forma rotondeggiante, arriva a misurare 1-2 mm

a termine e si va progressivamente ad incastrare nella microcaruncola uterina, costituendo così il microplacentoma (**Fig. 1.2.4**) (Abd-Elnaeim M. et al., 2003).

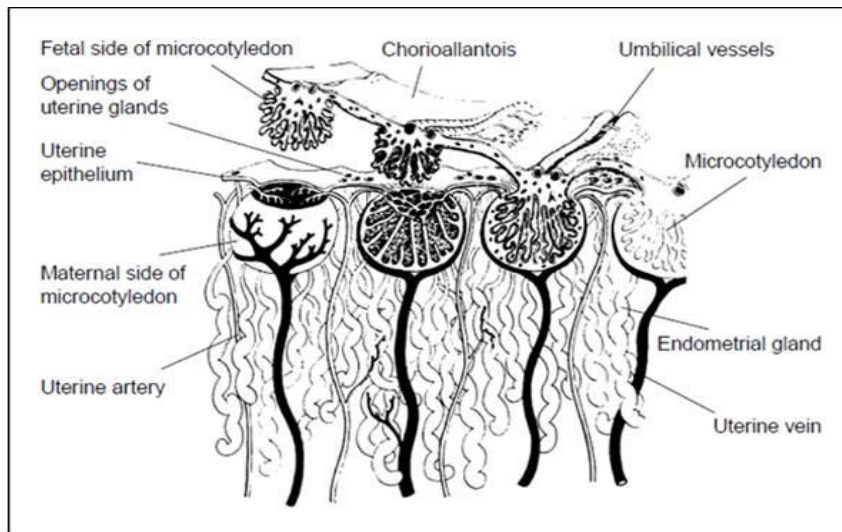


Figura 1.2.4 Rappresentazione schematica della struttura e della vascolarizzazione dei microcotiledoni e delle microcaruncole, in cui si nota il sistema di interdigitazione tra la componente fetale e materna. (da Steven e Samuel, 1975).

1.2.2 Vascolarizzazione della placenta

Si rammenta brevemente l'anatomia delle arterie e delle vene che irrorano l'utero per poi procedere con la descrizione della microvascolarizzazione dell'unità utero-placentare.

L'**arteria uterina** nel cavallo origina poco distalmente alla biforcazione dell'arteria iliaca esterna e si distribuisce alla quasi totalità del corno uterino ipsilaterale ed alla parte adiacente del corpo di quest'ultimo; si divide in tre rami, uno per la parte craniale del corno che irroro insieme al ramo uterino dell'arteria ovarica, un altro, principale, per la parte media e la base del corno, l'ultimo per il corpo dell'utero, a ridosso del quale raggiunge

il ramo uterino dell'arteria vaginale, che proviene dall'arteria pudenda interna.

Le **vene** dell'utero sono satelliti delle arterie, formano un'arcata anastomotica che si riunisce in una grossa vena che segue l'organo, la vena marginale dell'utero (**Fig. 1.2.5**) (Barone R., 2003).

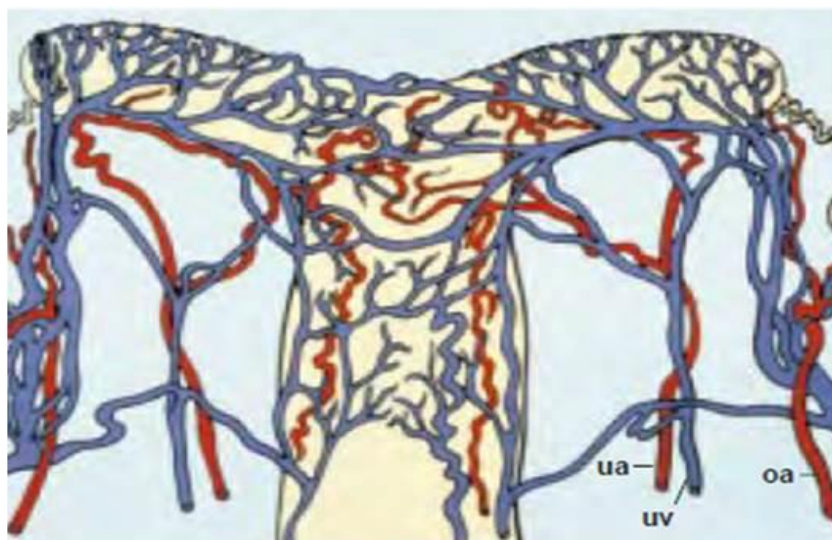


Figura 1.2.5 Vascolarizzazione dell'utero nella cavalla. Arteria uterina (ua), vena uterina (uv), arteria ovarica (oa), vena ovarica (ov) (da Ginther, 1998).

La **circolazione placentare** (utero-placentare) è la risultante di una componente materna e di una fetale che si realizza attraverso le arterie e le vene ombelicali. Gli scambi tra madre e feto dipendono principalmente dalla perfusione materna e fetale, il cui volume dipende soprattutto dalla dimensione dei microplacentomi, che aumenta progressivamente con l'avanzare della gravidanza.

Ogni microplacentoma è irrorato da un'arteria di medio-grande calibro da parte materna e da una di grandezza equivalente da parte fetale (**Fig. 1.2.6**) (Steven DH. e Samuel CA., 1975).

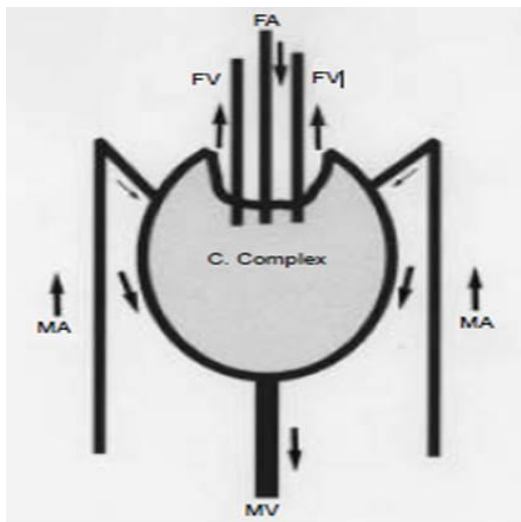


Figura 1.2.6 Disegno schematico del flusso sanguigno nel microplacentoma. Sono visibili l'arteria microcotiledonare fetale (FA), le vene microcotiledonari fetali (FV), le arterie microcaruncolari materne (MA), la vena microcaruncolare materna (MV) e il complesso capillare (C). Le frecce indicano la direzione del flusso sanguigno (da Abd-Elnaeim, 2003).

Superficie fetale

I vasi sanguigni fetali si sviluppano nel mesoderma della parte allantoidea e vascolarizzano l'allantocorion (Ginther OJ., 1998).

Ogni microcotiledone è irrorato da un'arteria microcotiledonare, che, dopo un breve tratto, si divide in 4-5 arterie secondarie; queste si suddividono a loro volta in branche più piccole in corrispondenza dei villi intermedi. Lo scheletro vascolare dei villi fetali è formato quindi da capillari di vario diametro che insieme costituiscono la rete di comunicazione (**Fig. 1.2.7**).

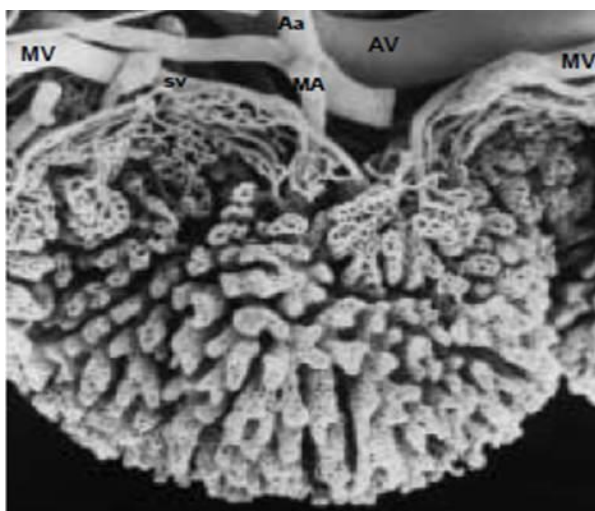


Figura 1.2.7 Vascolarizzazione del microcotiledone fetale. Nel cast sono visibili l'arteria microcotiledonare (MA), che origina dall'arteria allantoicorionica (Aa) e due vene microcotiledonari (MV) che originano da almeno due rami venosi (sv) e confluiscono nella vena allantoicorionica (AV). (da Abd-Elnaeim, 2003).

Il drenaggio è affidato a 2-3 vene microcotiledonari che decorrono parallelamente all'arteria (Abd-Elnaeim M. et al., 2003).

Superficie materna

Il sangue ossigenato che arriva alla placenta proviene dall'arteria uterina e dai rami delle arterie ovarica e vaginale.

Durante la gravidanza, le arterie aumentano di volume e i capillari placentari si sviluppano secondo una disposizione specie-specifica che riflette la struttura interna tridimensionale della placenta (Dellman HD., 2000). Dalle arterie uterine il flusso scorre ai vasi subendometriali ed alla superficie delle microcaruncole tramite le arterie microcaruncolari materne; queste, dopo un breve ma tortuoso percorso si dividono in 4 o 5 arterie terminali che con ulteriori ramificazioni danno origine al complesso capillare (**Fig. 1.2.8**).

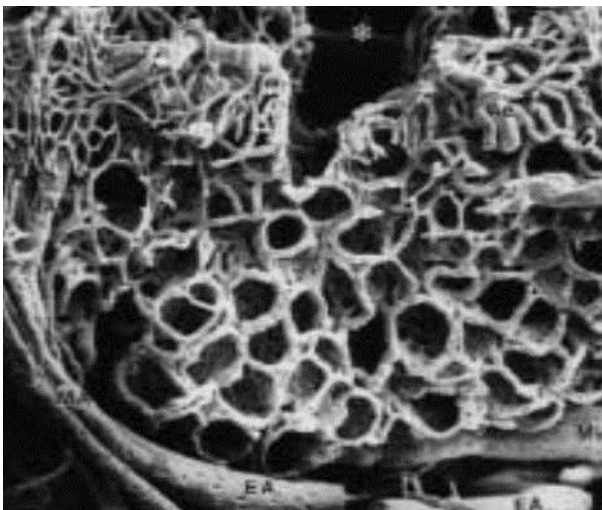


Figura 1.2.8 Vascolarizzazione della microcaruncola materna. Nel cast sono visibili l'arteria microcaruncolare (MA) che origina dalle arterie endometriali (EA) e si dirama in arteriole (Ae) vicino alla apice della microcaruncola. Le arteriole si dividono a loro volta in capillari che vanno a formare lo scheletro vascolare dell'orificio o cripta primaria (*), dei lati e della base della microcaruncola. Una vena microcaruncolare (Mv) origina dalla base della microcaruncola (da Abd Elnaeim, 2003).

Da quest'ultimo originano poi le venule che confluiscono in un'unica vena drenante alla base di ogni microcaruncola (Abd-Elnaeim et al., 2003).

Per l'efficienza degli scambi placentari è fondamentale la velocità del flusso sanguigno, determinata dalla sua direzione sia nel versante materno che fetale. La placenta equina è caratterizzata dall'aver due flussi che scorrono in direzione opposta e si incrociano, formando il sistema “*countercurrent*” (**Fig. 1.2.9**), ritenuto il più efficiente poiché permette l'equilibrio artero-venoso dei gas. Sembra probabile che il sangue capillare possa scorrere dalla punta alla base di ogni ramificazione del villo e così nella direzione opposta del flusso capillare materno.

Le placente sono classificate anche sulla base degli strati che separano le due circolazioni poiché il numero degli strati influenza il meccanismo di trasporto attivo o trasferimento vescicolare. La placenta epiteliocoriale è considerata meno efficiente e più primitiva di quella emocoriale (Silver M. e Steven DH., 1975).

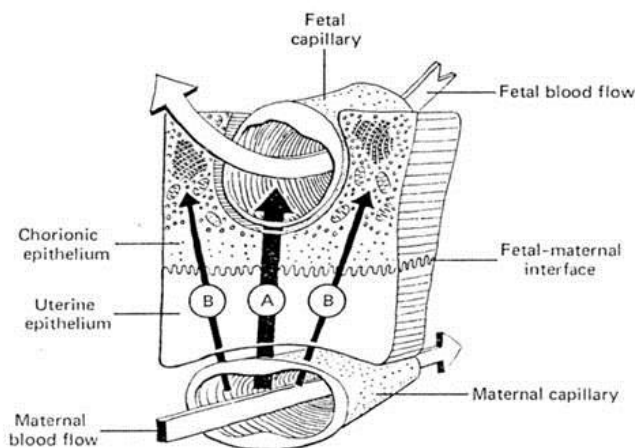


Figura 1.2.9 Disegno schematico dell'interfaccia materno-fetale (Fetal-maternal interface) e del flusso controcorrente tra comparto materno (uterine epithelium) e fetale (Chorionic epithelium) in gestazione avanzata. A) via diretta (principale) degli scambi dai capillari materni a quelli fetali, B) via parallela degli scambi dai capillari materni alla placenta fetale (da Samuel et al., 1976).

1.3 MONITORAGGIO ECOGRAFICO DELL'UNITÀ FETO-PLACENTARE NELLA FATTRICE

1.3.1 Ecografia bidimensionale

La gravidanza equina si può monitorare ecograficamente a partire da circa 12 giorni di gestazione fino al termine, con approccio transrettale e/o transaddominale, a seconda della finestra di visualizzazione dell'unità feto-placentare all'avanzare dell'età gestazionale (Bucca S., 2011). Le scansioni percutanee transaddominali essendo meno invasive permettono di estendere i tempi di osservazione ed una visualizzazione migliore della regione ventro-laterale dell'utero gravido. Gli aspetti della parte caudale dell'utero gravido invece possono essere esplorati solo attraverso l'ecografia transrettale (Pipers FS. e Adams-Brendemuehl CS., 1984).

Ad oggi, l'ecografia bidimensionale è comunemente impiegata per valutare il benessere feto-placentare ed è utile, in particolare in assenza di sintomatologia clinica, per identificare fattrici a rischio di incorrere in una gravidanza od un parto anormale, così da sottoporle a monitoraggio ed interventi terapeutici (Bucca S. et al., 2005). Infatti, le patologie placentari sono la principale causa di aborto nelle cavalle e la difficoltà nel diagnosticarle tempestivamente compromette l'esito dei trattamenti medici (Giles RC. et al., 1993).

La tecnologia Doppler permette di migliorare il riconoscimento di una compromissione negli scambi materno-fetali, in particolare quando è sospettata una alterazione del letto vascolare (McGladdery AC. et al., 1993); tuttavia, la complessità della vascolarizzazione placentare e la difficoltà di approccio alle strutture vascolari limitano l'utilizzo routinario di questa tecnica (Bucca S., 2011).

1.3.1.1 Ecografia transrettale

Mentre l'approccio transaddominale fornisce un'ampia visualizzazione del feto e della maggior parte dell'unità utero-placentare, la porzione caudale dell'allantocorion (stella cervicale), a livello di polo placentare cervicale può essere visualizzata solo per via transrettale. Questa finestra fornisce le migliori condizioni per esaminare l'ecogenicità dei liquidi fetali e per valutare dal punto di vista morfo-metrico l'unità utero-placentare; lo spessore combinato di utero e placenta (SCUP) viene misurato tra il ramo medio dell'arteria uterina e l'interfaccia con il liquido allantoideo (**Fig. 1.3.1**) (Troedsson MH. E Sage AM., 2001).



Figura 1.3.1 Misurazione dello spessore combinato di utero e placenta (SCUP) al polo placentare cervicale. Si possono vedere la cervice (Cervix), il liquido allantoideo (Allantois) separato dal liquido amniotico (Amnion) dal foglietto amniotico (A) e lo SCUP (lo spessore compreso tra le x) (da Troedsson e Macpherson, 2011).

In letteratura sono disponibili diversi studi relativi alla misurazione seriale dello SCUP nel corso della gravidanza nella fattrice.

Lo SCUP rimane sostanzialmente costante, intorno ai 4 mm, tra il IV e l'VIII mese di gestazione, per poi aumentare in modo significativo ogni mese tra il IX ed il XII (**Tabella 1.3.1**) (Renaudin CD. et al., 1997; Troedsson MH. e Sage AM., 2001).

Ultrasonographic Approach	Month of Pregnancy	Mean of CTUP (mm)	95% CI (mm)	
			Lower Limit	Upper Limit
Rectal	Month 4	3.98	3.81	4.47
	Month 5	3.58	3.50	3.81
	Month 6	3.84	3.78	4.04
	Month 7	3.91	3.86	4.07
	Month 8	4.33	4.21	4.69
	Month 9	4.38	4.28	4.66
	Month 10	5.84	5.53	6.77
	Month 11	7.35	6.93	8.54
	Month 12	9.52	8.51	11.77

Tabella 1.3.1 Misurazione dello spessore combinato di utero e placenta (CTUP) al polo placentare cervicale, per via transrettale, dal IV mese al XII mese di gestazione. Nella tabella viene riportata l'età gestazionale in mesi ed il rispettivo valore del CTUP (mm) espresso come mediana, valore minimo e valore massimo, con intervallo di confidenza (CI) del 95%. (da Renaudin et al., 1996).

Nella pratica clinica, lo SCUP viene solitamente misurato a partire dal VI mese di gestazione. Bucca et al. (vedi Tabella 1.3.2) riportano valori dello SCUP in corso di gravidanze normali leggermente superiori, con un valore pari a 4.7 ± 0.2 al VI mese che aumenta progressivamente fino a 15.7 ± 5.6 mm a termine (Bucca S. et al., 2005).

La misura dello SCUP può essere influenzato da numerose cause patologiche che riducono l'efficienza degli scambi, come placentiti, edema placentare e distacco prematuro della placenta (Adams-Brendemuehl C. e Pipers FS., 1987). Molte placentiti infatti originano da infezioni ascendenti ed il primo sintomo è l'aumento dello SCUP a livello di polo cervicale (Renaudin CD. et al., 1999).

1.3.1.2 Ecografia transaddominale

L'esame ecografico transaddominale consente di valutare lo spessore delle membrane fetoplacentari (Troedsson M. e Sage AM., 2001), la profondità e qualità dei fluidi fetali durante la gestazione avanzata (Adams-Brendemuehl C. e Piper FS., 1987) ed il benessere del feto (Bucca S. et al.,

2005). Questo approccio può essere impiegato dopo i primi 90 giorni circa di gestazione, quando l'utero gravido man mano scende oltre il bordo del bacino ed è visibile dalla parte ventrale dell'addome. Nel primo periodo della gravidanza il feto è visibile solo nella zona inguinale e tra le ghiandole mammarie; in tarda gestazione il feto si sposta progressivamente più cranialmente, quindi l'area da valutare si estende fino alla cartilagine xifoidea e lateralmente fino a livello delle grasselle su entrambi i lati (Pipers FS. e Adams-Brendemuehl C., 1984).

Nella routine, le immagini transaddominali vengono acquisite con una sonda da 2,5 o 3,5 MHz, che consente una visualizzare fino a 20-30 cm di profondità (Allen KA. E Stone LR., 1990).

Spessore combinato utero-placenta

Le valutazioni morfo-metriche sono state eseguite a vari stadi di gestazione ed in differenti aree della superficie addominale (**Tabella 1.3.2**) (Bucca S. et al., 2005; Reef VB. et al., 1996; Renaudin et al., 1997).

	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
LCD	7.08 ± 2.5	6.1 ± 2.0	7.29 ± 1.6	7.33 ± 2.23	7.67 ± 1.63	10 ± 5.14	10.1 ± 4.39
MCD	5.2 ± 1.04	6.57 ± 1.38	7.97 ± 2.34	8.07 ± 1.47	7.8 ± 2.0	9.01 ± 2.37	10.75 ± 5.9
RCD	5.6 ± 2.24	6.22 ± 1.65	7.8 ± 1.68	8.22 ± 1.86	7.22 ± 1.28	9.34 ± 2.91	9.5 ± 4.8
LM	5.6 ± 1.1	6.25 ± 1.61	6.98 ± 1.24	7.73 ± 2.79	8.66 ± 3.37	9.89 ± 4.01	10.7 ± 3.5
MM	5.1 ± 1.0	5.07 ± 1.49	6.46 ± 0.5	7.48 ± 2.1	8.7 ± 3.37	9.44 ± 3.37	11.1 ± 5.56
RM	5.17 ± 0.8	5.15 ± 1.55	7.58 ± 1.86	9.43 ± 5.6	8.7 ± 2.6	9.6 ± 3.81	8.88 ± 3.25
LCR	6.0	5.02 ± 1.11	5.98 ± 1.39	5.85 ± 1.69	7.6 ± 3.43	7.06 ± 2.73	7.58 ± 3.8
MCR	3.5	5.17 ± 1.65	7.84 ± 2.5	5.86 ± 1.15	6.7 ± 2.4	6.75 ± 2.3	5.95 ± 1.66
RCR	2.9	5.06 ± 0.8	6.01 ± 1.8	6.8 ± 2.5	7.2 ± 3.8	7.53 ± 2.99	6.38 ± 2.76
CX P	4.7 ± 0.2	5.0 ± 0.5	5.2 ± 0.8	7.7	8.3 ± 2.59	9.56 ± 2.42	15.7 ± 5.6

Tabella 1.3.2 Misurazione dello spessore combinato di utero e placenta (SCUP) dal VI mese al XII mese di gestazione (G6-G12) in nove quadranti addominali, per via transcutanea ed al polo placentare cervicale, per via transrettale. Denominazione dei quadranti: sinistro caudale (LCD), medio caudale (MCD), destro caudale (RCD), sinistro mediale (LM), medio medio (MM), destro mediale (RM), sinistro craniale (LCR), medio craniale (MCR), destro craniale (RCR); polo cervicale (CX P) (da Bucca S. Et al., 2005).

Per lo SCUP, è importante che il feto non comprima il corion-allantoide inficiandone la misura. Lo SCUP mostra una differenza significativa nel corso dei mesi di gravidanza (Renaudin CD. et al. 1997), inoltre, le misurazioni variano molto tra il corno gravido ed il non-gravido, che appare ampiamente corrugato.

Valutazione dei liquidi fetali

La profondità dei liquidi fetali viene utilizzata per valutare il volume totale degli stessi, che può aumentare o diminuire in condizioni patologiche; normalmente la profondità massima del liquido allantoideo è pari a 13.4 ± 4.4 cm e quella del liquido amniotico è pari a 7.9 ± 3.5 cm (**Fig. 1.3.2**).

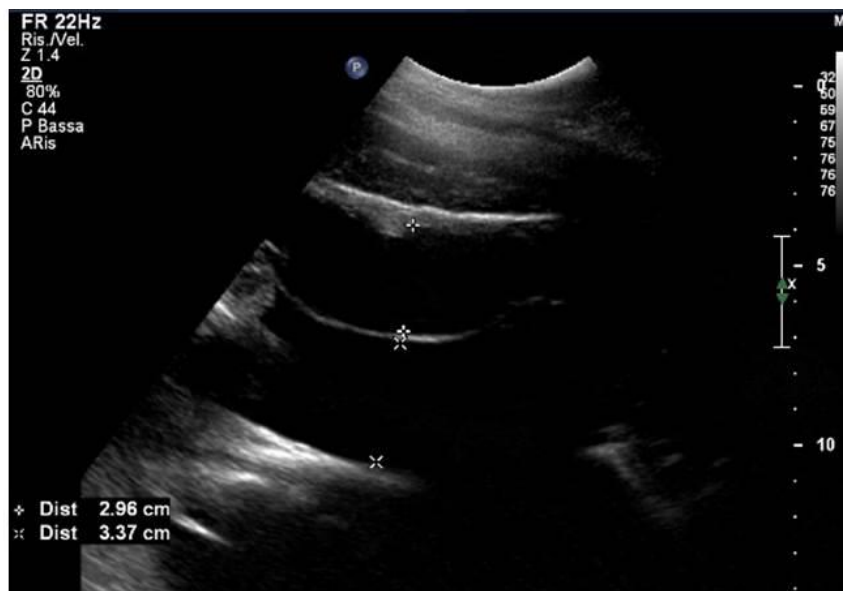


Figura 1.3.2 Misurazione della profondità dei liquidi fetali dall'immagine bidimensionale per via transaddominale. Liquido allantoideo in alto e liquido amniotico in basso nell'immagine. I due liquidi sono divisi dalla membrana amniotica. L'immagine è relativa ad una gravidanza al VI mese (da Troedsson e Sage, 2001).

Particelle (*vernix*) libere fluttuanti sono visibili nei fluidi fetali dalla metà al termine della gestazione. Con l'avanzare della gestazione la cute del feto rilascia cellule desquamate e detriti che creano una sorta di pulviscolo

nel liquido amniotico. Particelle libere nel liquido allantoideo possono riflettere la funzionalità renale. Un importante aumento dell'ecogenicità dei fluidi può essere associato a gravi complicanze, come il passaggio del meconio (Bucca S., 2011).

Profilo biofisico fetale

Analogamente alla medicina umana, è stato ideato anche per la fattrice un sistema a punteggio detto “profilo biofisico fetale” per monitorare il benessere e la crescita del feto (Bucca S., 2011). Dagli iniziali 5 parametri (Adams Brendemuehl C. e Pipers FS., 1987), oggi i parametri inclusi nel profilo biofisico fetale sono: frequenza cardiaca fetale, attività e tono fetale, diametro aortico, spessore ed integrità utero-placentare e profondità massima dei liquidi fetali (Reef VB. et al., 1996).

La profondità dei liquidi, lo spessore e il contatto utero-placentare sono stati trattati in precedenza.

Frequenza cardiaca fetale

Solitamente viene valutata utilizzando l'ecografia M-mode (Curran S. e Ginther OJ., 1995) (**Fig. 1.3.3**) oppure tramite Doppler pulsato.

Il ritmo e la frequenza cardiaca fetale (FC) e la sua variabilità rappresentano due degli indicatori più sensibili del benessere fetale (Bucca S. et al., 2005). Un esito sfavorevole della gravidanza è stato associato a bradicardia o tachicardia fetale. Il ritmo cardiaco del feto equino sano è di solito regolare e la FC fetale raggiunge il picco a 3 mesi di gestazione con una media di 196 battiti al minuto, per poi diminuire progressivamente durante la gravidanza (Ginther OJ. e Griffin PG., 1993). Una FC basale di 75 ± 7 bpm è riportata durante la gestazione avanzata (Reef VB. et al., 1995).

Le variazioni della frequenza cardiaca fetale dipendono dall'entrata in funzione del sistema nervoso centrale (CNS) e si verificano in risposta alle alterazioni ambientali e all'attività fetale (Bucca S. et al., 2005). Episodi di variabilità della frequenza cardiaca fetale (accelerazioni e decelerazioni), aumentano con il progredire della gestazione e transitorie accelerazioni di solito coincidono con periodi di attività. Generalmente l'attività fetale spontanea comporta accelerazioni della frequenza cardiaca fetale di entità pari a 25-40 battiti al minuto e 20-40 s di durata. Attività fetale più vigorosa e tachicardia si verificano 48-72 h prima del parto (Adams-Brendemuehl CS. e Pipers FS., 1987).

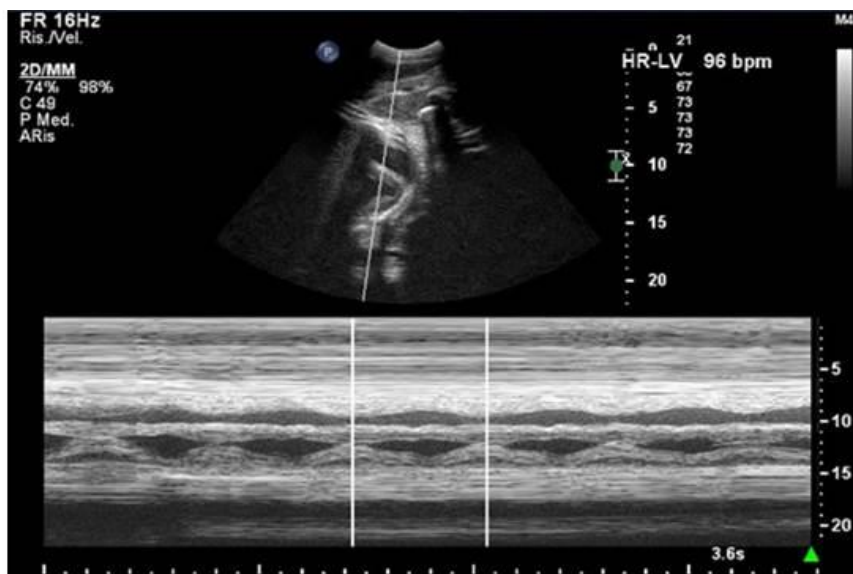


Figura 1.3.3 Valutazione della frequenza cardiaca (FC) fetale tramite M-mode. In alto l'immagine bidimensionale del torace fetale cui è sovrapposta la linea cursore a livello del cuore, in basso il tracciato M-mode da cui viene ricavata la FC, selezionando un ciclo cardiaco. HR-LV: FC del ventricolo sinistro.

Attività e tono fetale

Come anticipato, il feto mostra solitamente dei movimenti durante un esame ecografico, come ad esempio flessione e distensione degli arti (Reef

VB. et al., 1995). Con il progredire della gestazione i movimenti divengono più complessi, il feto muove la testa, il naso, le labbra, compie azioni di suzione, movimenti auricolari, avanzamento nell'utero, rotazioni lungo il proprio asse (Bucca S. et al., 2005).

Diametro aortico fetale

Il diametro aortico è correlato al peso materno ed è un ottimo indicatore delle dimensioni del feto. Viene misurato, una volta visualizzato nel torace l'arco aortico, da una parete all'altra del vaso durante la sistole (**Fig.1.3.4**). Il range normale varia da 18.5 a 27 mm nel corso della gravidanza normale (Reef VB. et al., 1995).

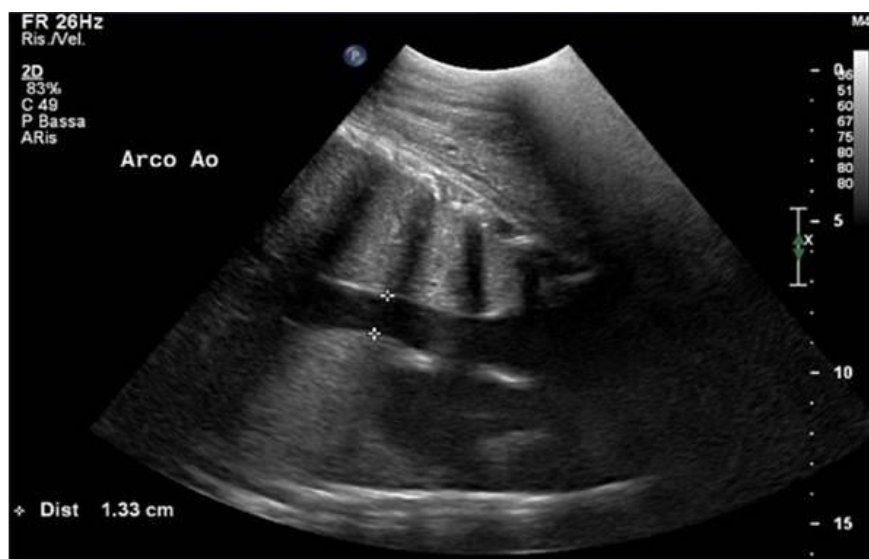


Figura 1.3.4 Misurazione del diametro aortico fetale per via transaddominale. La misurazione viene eseguita manualmente a livello di arco aortico in fase sistolica. La testa della fattrice si trova verso sinistra rispetto all'immagine.

Altri parametri e strutture fetali valutabili all'esame ecografico sono:

- l'orbita oculare: la dimensione dell'orbita si ottiene dalla misurazione dei due diametri ortogonali; essa risulta valutabile sia per via transrettale, solitamente, che transaddominale ed è un indice piuttosto correlato all'età

del feto (Bucca S. et al., 2005);

- i movimenti respiratori, osservabili come movimenti coordinati del diaframma e delle coste (Bucca S. et al., 2005);

- la trachea, lo stomaco, i reni e le gonadi (Bucca S. et al., 2005);

- il polso carotideo, valutato per via transrettale in M-mode (Bucca S. et al., 2007).

1.3.2 Esame Doppler del flusso uterino

Lo studio flussimetrico dell'arteria uterina valuta l'impedenza del letto vascolare ad essa distale e cioè della vascolarizzazione endometriale, dando una stima qualitativa dell'efficacia del processo di placentazione.

Una serie di studi hanno utilizzato la metodica Doppler, in particolare ad onda pulsata, per valutare il flusso uterino nella fattrice durante il ciclo estrale e durante la gravidanza, così come il flusso ombelicale (Bollwein H. et al., 1998; Bollwein H. et al., 2003; Bollwein H. et al., 2004; McGladdery AJ. et al., 1993; Ousey JC. et al., 2012).

Usando dei trasduttori lineari o micro-convex possono essere valutate le arterie uterine con ecografia transrettale e le arterie ombelicali con approccio transrettale o transaddominale, secondo lo stadio di gravidanza.

I segnali Doppler rappresentati in funzione del tempo creano uno spettro d'onda con una componente sistolica ed una diastolica, da cui possono essere misurate le velocità sistolica (PSV, velocità sistolica massima o di picco) e tele-diastolica (EDV, velocità diastolica finale) e derivati diversi indici. Tra questi, i più comunemente applicati per quantificare il flusso sono l'indice di Resistenza o di Pourcelot (IR) ed in minor misura l'indice di Pulsatilità (IP), calcolati tramite le seguenti formule:

$$IR = (PSV - EDV) / PSV; \quad IP = (PSV - EDV) / M$$

ove M è la velocità media. Essendo rapporti fra diverse parti dell'onda flussimetrica quali la PSV, la EDV e la M , gli indici sono indipendenti dai fattori di imprecisione insiti nella misurazione della velocità, dovuti alla dipendenza dall'angolo di insonazione per il calcolo della stessa. IR e IP forniscono informazioni sulla perfusione a valle del sito di misurazione; sono quindi misure indirette del flusso ematico verso un organo o tessuto, basate sulla resistenza al flusso verso tale organo (Bailey CS. et al., 2012): l'IR diminuisce quando c'è una minor impedenza al flusso nella vascolarizzazione distale (Bollwein H. et al., 2003). Per esempio, l'IR delle arterie uterine ed ombelicali rappresenta l'impedenza al flusso rispettivamente nel compartimento materno e fetale della placenta (Ousey JC. et al., 2012).

Se sono noti l'angolo di insonazione ed il diametro, quindi l'area del vaso, può essere calcolato il volume di flusso ematico a livello dell'arteria (TABF, flusso ematico arterioso totale o BFV, volume di flusso ematico), attraverso delle formule (Bollwein H. et al., 2004; Bailey CS. et al., 2012). La riduzione dell'IR a livello delle arterie uterine è associata ad un corrispondente incremento nel BFV relativo alla crescente richiesta metabolica dei tessuti fetali e placentari (Ousey JC. et al., 2012). Tuttavia, il calcolo del flusso risente degli errori relativi alla misurazione della velocità, del peso stimato del feto e del diametro del vaso ed, essendo il raggio elevato al quadrato, lo sarà anche l'errore insito nella sua misurazione.

Le alterazioni emodinamiche rilevate con il Doppler possono precedere di molte settimane alterazioni nel benessere fetale rilevate all'ecografia transaddominale (Vaala WE., 2011). Inoltre, la flussimetria Doppler è stata anche utilizzata per valutare l'effetto di vari trattamenti, come per esempio la pentossifillina, per aumentare il flusso utero-placentare (Bailey CS. et al., 2012; Ousey JC. et al., 2010).

1.4 ESAME ECOGRAFICO CON MEZZO DI CONTRASTO: PRINCIPI ED APPLICAZIONI

L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) è una tecnica non invasiva che permette di migliorare il segnale del flusso vascolare in vari organi e, a differenza delle altre tecniche di *imaging*, di valutare la microperfusion.

Ad oggi, i mezzi di contrasto (mdc) a base di microbolle di gas sono considerati stabili, sicuri per applicazioni ecografiche e ben tollerati dai pazienti. I mdc approvati in Europa e maggiormente impiegati in ambito clinico appartengono alla seconda generazione e sono costituiti da un gas insolubile racchiuso in un guscio esterno elastico di fosfolipidi (Rossi F., 2007).

Attualmente il diametro delle microbolle è compreso tra 3 e 10 μm , esse persistono all'interno dei vasi sanguigni (effetto blood-pool) per alcuni minuti e vengono eliminate per via polmonare (Quaia E., 2007).

L'aumento della riflettività del sangue (*enhancement*) è il principio di funzionamento fondamentale dei mdc ecografici ed è dovuto alle proprietà fisiche delle microbolle quando vengono insonate alla loro *frequenza di risonanza caratteristica*; questa si trova nel *range* delle frequenze usualmente impiegate in l'ecografia. Tuttavia, il sistema ecografico convenzionale non permette un'adeguata visualizzazione del mdc ecografico e sono necessari software specifici, in grado di amplificare il segnale di ritorno proveniente dal mdc rispetto a quello proveniente dai tessuti, permettendone la distinzione (Phillips P. e Gardener E., 2004).

L'analisi delle immagini ecocontrastografiche può essere oltre che qualitativa, quindi basata su una valutazione visiva soggettiva del pattern di *enhancement*, di tipo quantitativo. A tal fine, tramite software specifici, si

può quantificare la perfusione di una regione d'interesse (ROI) da parte del mdc in funzione del tempo. I dati ottenuti possono essere rappresentati nelle curve di perfusione o curve intensità-tempo, da cui possono essere derivati diversi parametri utili a descrivere le variazioni emodinamiche nell'area analizzata. Tra questi, i più importanti sono: il tempo che intercorre tra l'iniezione e l'arrivo del mdc (AT), l'intensità del segnale di base, durante AT (BI), il tempo tra l'iniezione ed il picco di *enhancement* (TTPinj), l'intensità di *enhancement* al picco (PI), il tempo tra l'incremento iniziale ed il picco di *enhancement* (TTPinr = TTPinj-AT), la pendenza della curva durante la fase di riempimento (*Wash in*) e di svuotamento (*Wash out*) (**Fig. 1.4.1**) (Rossi F., 2007).

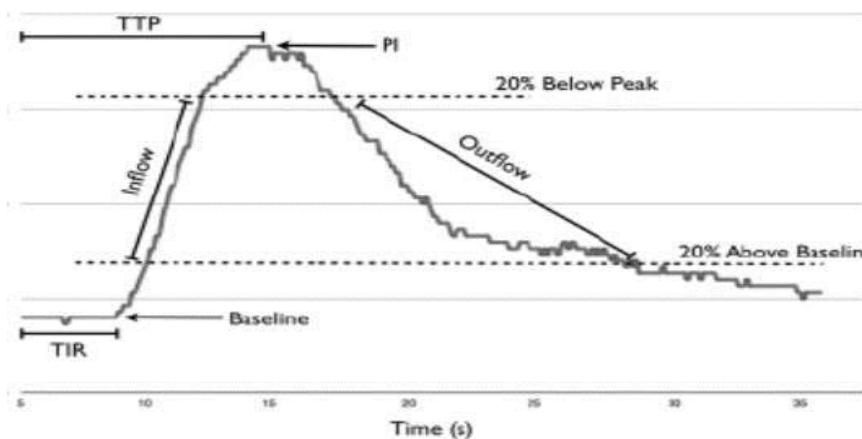


Figura 2.1.3 Grafico rappresentativo di una curva intensità-tempo: tempo tra l'iniezione e l'arrivo del mezzo di contrasto (TIR), tempo tra iniezione e picco di *enhancement* (TTP), intensità di *enhancement* al picco (PI), fase di presa di contrasto (Inflow), fase di dilavamento (Outflow) (da Jimenez et al., 2011).

In medicina umana l'*European Federation of Societies for Ultrasound In Medicine and Biology* (EFSUMB) pubblicò le prime linee guida sull'utilizzo della CEUS nel 2004 (Cludon M. et al., 2008). Le ultime linee guida del 2011 sulle applicazioni non epatiche del mezzo di contrasto

offrono una panoramica sull'utilizzo clinico in alcune patologie quali, gastrointestinali, pancreatiche, spleniche, linfonodali, genito-urinarie, vascolari, polmonari e pleuriche, renali, nei traumi addominali, nella risposta alla chemioterapia di alcuni tumori. Ed inoltre una serie di nuove prospettive per un utilizzo sempre più ampio dell'ecocontrastografia in campo clinico. (Piscaglia F. et al., 2011).

In medicina veterinaria dei piccoli animali l'ecografia con mezzo di contrasto è usata principalmente nella valutazione della perfusione di organi addominali, quali pancreas, intestino e rene nel gatto sano (Leinonem MR. et al., 2010; Diana A. et al., 2011) e linfonodi, milza , fegato e reni nel cane sano (Waller KR. et al., 2007; Gaschen L. et al., 2011). Questa tecnica è stata usata anche per caratterizzare lesioni spleniche (Ohlerth S. et al., 2007), epatiche (Kutara K. et al., 2006; Nakamura K. et al., 2010) e renali (Haers et al., 2010; Haers H. et al., 2013) e per la diagnosi di shunt porto-sistemici congeniti (Salwei RM. et al., 2003). Un lavoro è stato condotto sui disturbi prostatici nel cane (Russo M. et al., 2012). In campo ginecologico, la CEUS è stata usata per valutare la microcircolazione del corpo luteo e delle ovaie nella pecora (Marret H. et al., 2005; Marret H. et al., 2006; Sboros V. et al., 2011).

Applicazioni in campo ostetrico hanno dimostrato la possibilità di monitorare e quantificare la perfusione utero-placentare nella donna, nei primati e nel ratto (Arthuis CJ. et al., 2013; Barth WH. et al., 2006; Orden MR et al., 1999; Ragavendra N. e Tarantal A., 2001; Schmiedl UP. et al., 1999; Zhou YJ. et al., 2013).

CAPITOLO 2 - PARTE SPERIMENTALE PROSPETTICA

Recenti studi hanno dimostrato che la CEUS (*Contrast-enhanced ultrasound*) consente di valutare quali-quantitativamente la perfusione utero-placentare in condizioni normali e patologiche, a differenza delle valutazioni emodinamiche ottenute indirettamente tramite tecnica Doppler a livello delle arterie uterine.

A nostra conoscenza, non sono riportati in letteratura studi sull'utilizzo della CEUS per alcuna applicazione in medicina equina.

Anche nella fattrice, la disponibilità di un metodo sicuro ed accurato per quantificare la perfusione utero-placentare aumenterebbe le potenzialità di indagare la patogenesi e la gravità di condizioni patologiche che comportano la compromissione della superficie di scambio materno-fetale ed in particolare del letto capillare così come di stimare la risposta ai trattamenti vasodilatatori ed antitrombotici.

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare, per la prima volta nella specie equina, l'applicazione dei mezzi di contrasto di II generazione (Sonovue®), al fine della valutazione quantitativa della perfusione uterina in corso di gravidanza fisiologica, associando la metodica all'esame Doppler delle arterie uterine ed al monitoraggio ecografico convenzionale dell'unità feto-placentare al fine di valutarne gli effetti sul benessere materno-fetale.

2.1 MATERIALI E METODI

2.1.1 Animali

Lo studio è stato condotto su due cavalle sane di razza Trottatore; le fattrici, di età 8 e 9 anni e peso rispettivamente di 480 kg e 462 kg, entrambe unipare, sono state selezionate sulla base dell'esame obiettivo generale e particolare degli apparati cardiocircolatorio e riproduttivo, ed esami collaterali di laboratorio ecografico degli organi genitali ed ecocardiografico di base. Tutte le valutazioni sono risultate nella norma.

Le fattrici sono state fecondate tramite inseminazione artificiale con seme fresco dello stesso stallone di razza Trottatore; la gravidanza e la sede di impianto dell'embrione sono state convenzionalmente accertate per via ecografica a 14-15 giorni e a 30 giorni dall'intervento fecondativo.

Analogamente, i giorni di gestazione sono stati quindi calcolati per ciascun soggetto a partire dalla data dell'ultimo intervento fecondativo.

Le cavalle sono state mantenute al pascolo ed alimentate con concentrati e fieno *ad libitum* per tutta la durata della gravidanza e sono state ricoverate presso l'Unità di Perinatologia Equina "Stefano Belluzzi" (UPE) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie di Bologna nel corso dell'ultimo mese di gestazione.

Le fattrici hanno partorito sotto supervisione presso l'UPE; tutti i dati concernenti il parto ed il secondamento sono stati registrati ed i parametri vitali dei neonati sono stati immediatamente valutati. L'esame clinico dei neonati e delle fattrici e la valutazione macroscopica degli annessi placentari sono stati eseguiti secondo i criteri internazionalmente adottati in Perinatologia equina. I puledri e le fattrici sono stati monitorati quotidianamente per due settimane e poi dimessi.

2.1.2 Protocollo di studio ecografico

Le fattrici sono state valutate ecograficamente ad intervalli di tempo prestabiliti durante tutto il corso della gravidanza. Per ciascuna sessione, l'esame ultrasonografico includeva le seguenti indagini:

- esame bidimensionale (2D) dell'unità utero-placentare e fetoplacentare,
- esame eco-contrastografico dell'unità utero-placentare,
- esame bidimensionale e Doppler delle arterie uterine.

L'età gestazionale a cui è stato eseguito ciascun esame ultrasonografico è espressa in giorni di gravidanza. L'approccio ecografico transrettale o transaddominale è stato scelto in base alla finestra di visualizzazione dell'unità fetoplacentare relativa all'età gestazionale ed è specificato per ciascun intervallo di tempo in tabella.

L'esame è stato eseguito al 40° giorno di gestazione e tra il 90° ed il 100° giorno di gestazione (IV mese); dal giorno 150 (VI mese) al 300 (XI mese) lo studio è stato ripetuto ad intervalli mensili ed ogni dieci giorni dal giorno 300 fino al parto. L'esame Doppler delle arterie uterine è stato eseguito prima della fecondazione (pre-FA) e poi agli stessi tempi dell'esame eco-contrastografico (**Tabella 2.1.1**).

	Giorni di gravidanza									
	pre-FA	40	90-100	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
Esame 2D	-	TR	TA	TR + TA	TR + TA	TR + TA	TR + TA	TR + TA	TR + TA	TR + TA
CEUS	-	TR	TA	TA	TA	TA	TA	TA	TA	TA
Doppler Aa. uterine	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR

Tabella 2.1.1 Tabella riassuntiva delle modalità ecografiche e della rispettiva finestra d'esame eseguite durante ciascun esame ultrasonografico nel corso della gravidanza. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione, TR: trans-rettale, TA: trans-addominale.

2.1.2.1 Esame clinico

Le fattrici sono state sottoposte ad esame clinico generale e ginecologico-ostetrico prima di ogni studio ecografico. In particolare la frequenza cardiaca e respiratoria materna sono state rilevate sia prima che subito dopo l'esame ecocontrastografico.

2.1.2.2 Esame ecografico

L'esame ecografico è stato eseguito sulle cavalle in stazione, contenute in travaglio senza l'impiego di alcuna sedazione per non influenzare i parametri emodinamici e vitali del feto e della fattrice.

Per quanto riguarda l'esame transrettale, la cavalla è stata preparata tramite svuotamento manuale del retto e tramite l'inserimento della sonda lineare protetta da un guanto monouso ed opportunamente lubrificata.

Le cavalle sono state preparate per l'esame transaddominale tramite tricotomia, pulizia con alcool isopropilico al 70% della cute ed applicazione di gel ultrasonografico, a partire dalla ghiandola mammaria ed estendendo l'area cranialmente all'avanzare della gestazione, fino a raggiungere lo sterno ed il quadrante medio del fianco bilateralmente a termine.

Un catetere endovenoso in PVC da 13 gauge è stato introdotto sterilmente nella vena giugulare e connesso ad un rubinetto a tre vie.

L'esame bidimensionale e contrastografico è stato eseguito sempre dal medesimo operatore esperto utilizzando un ecografo *Philips*® *IU22* (Ultrasound System, Philips Healthcar, Monza, Italia) dotato di una sonda convex (5-2 MHz) per l'approccio transaddominale ed una sonda lineare (9-3 MHz) per l'esame transrettale. L'esame bidimensionale morfo-metrico dell'unità feto-placentare al polo cervicale è stato eseguito utilizzando un ecografo (*SonoSite Micromaxx*, WA, USA) dotato di sonda lineare 10-5MHz ad uso transrettale.

Tutti gli studi sono stati salvati in formato DICOM come immagini statiche o filmati per successive analisi e misurazioni in modalità *off-line*.

2.1.2.3 Esame ecografico bidimensionale

Per ciascun esame ecografico è stata preliminarmente eseguita la valutazione in modalità 2D real-time dell'unità feto-placentare, al fine di monitorare la crescita ed il benessere fetale durante l'intero corso della gravidanza. Tutti i parametri di valutazione inclusi nel monitoraggio feto-placentare sono stati esaminati e sono state eseguite le misurazioni secondo il protocollo convenzionalmente adottato in riproduzione equina.

A tal fine per via transrettale sono stati valutati lo spessore combinato utero-placentare (SCUP) e l'aspetto ecografico di tale unità al polo placentare cervicale, la presentazione fetale, il diametro dell'orbita e l'ecogenicità dei liquidi fetali nel compartimento caudale del corpo uterino. Per via transaddominale sono stati determinati l'attività ed il tono fetale, la frequenza cardiaca fetale (FC), il diametro aortico, lo spessore combinato ed il contatto utero-placentare, la profondità e la qualità dei liquidi fetali.

Nel corso dell'ecografia transcutanea, ciascun emi-addome della fattrice è stato esaminato ponendosi ipsilateralmente, a partire dalla regione subito craniale alla mammella fino a livello dell'ombelico o dello sterno in base all'età gestazionale e procedendo secondo linee para-sagittali e trasversali fino all'individuazione del feto e delle varie strutture anatomiche fetali oggetto di valutazione e misurazioni. Tutte le misurazioni sono state ripetute tre volte, quando possibile, durante ciascuna sessione d'esame ecografico.

Ai fini dello studio eco-contrastografico in oggetto, le valutazioni sono state focalizzate sull'aspetto morfo-metrico 2D dell'unità utero-placentare e sulla FC fetale come parametro indicativo di stress dello stesso.

2.1.2.3.1 Spessore combinato di utero e placenta (SCUP)

Ai fini della valutazione dell'aspetto e dello spessore dell'unità utero-placentare in differenti aree della superficie placentare, l'addome della parturiente è stato suddiviso in 9 quadranti, indicati come di seguito: craniale destro (CrD), medio-destro (MD), caudale-destro (CdD), craniale-medio (CrM), medio-medio (MM), caudale-medio (CdM), craniale-sinistro (CrS), medio-sinistro (MS), caudale-sinistro (CdS); per ciascuno sono state effettuate le misurazioni dello SCUP, evitando la presenza di contatto tra feto e parete (**Fig. 2.1.1**). Lo spessore dell'unità utero-placentare è stato misurato mantenendo la sonda il più perpendicolare possibile alla superficie stessa; misurazioni multiple sono state eseguite e poi espresse come media matematica. Inoltre è stata valutata ed annotata l'eventuale presenza di aree di discontinuità, ovvero di distacco, utero-placentare, identificabili come spazi sonolucidi compresi tra i due strati, avendo cura di distinguere tali aree dalla normale componente vascolare.

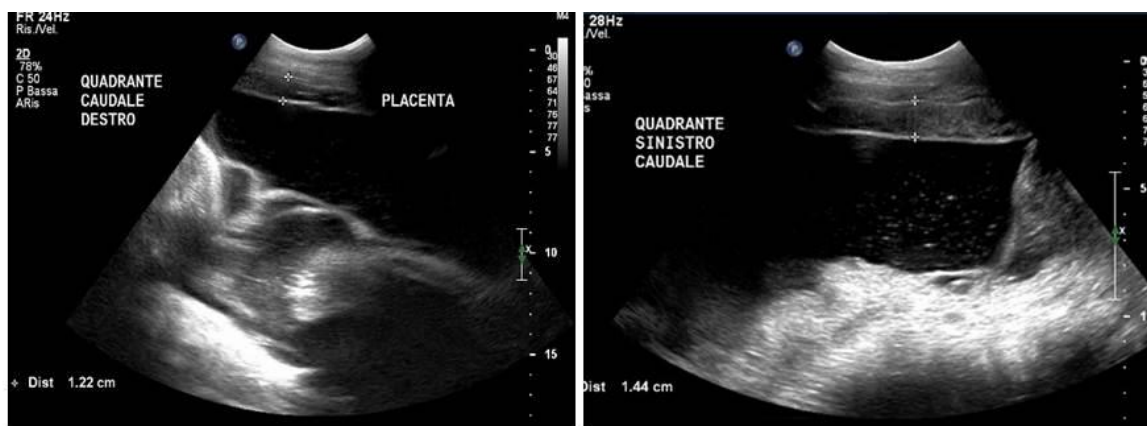


Figura 2.1.1 Esempi di misurazione dello spessore combinato utero-placentare (SCUP) a livello di alcuni quadranti addominali. Lo SCUP viene ottenuto tracciando manualmente la misura (cm). Complessivamente sono state effettuate le valutazioni morfo-metriche di 9 quadranti per ciascun esame ecografico; tra questi è stato poi selezionato il quadrante ottimale per l'esame contrastografico.

Per la determinazione dello SCUP per via transrettale, la sonda veniva posizionata alla giunzione placentocervicale, circa 2,5-5 cm cranialmente all'ostio cervicale interno, al fine di ottenere un'immagine di buona qualità, in cui fossero ben visualizzati l'area cervicale, le pareti ventrale e dorsale dell'utero e della placenta, lo spazio vascolare, in cui corre l'arteria uterina media tra l'utero e la vescica ed i liquidi fetali; inoltre il feto ed il foglietto amniotico non dovevano avere contatto con la placenta per non inficiarne la misura. Misurazioni multiple dello SCUP venivano eseguite a livello di aspetto ventrale del corpo uterino, in prossimità della cervice.

I dati relativi allo SCUP sono stati testati per distribuzione normale tramite test D'Agostino-Pearson; gli SCUP transaddominali sono stati espressi come media e deviazione standard mentre gli SCUP transrettali sono stati espressi come mediana, valore minimo e valore massimo.

2.1.2.3.2 Frequenza cardiaca fetale

La frequenza cardiaca fetale è stata rilevata, con la stessa metodica, sia immediatamente prima dell'esame eco-contrastografico, sia immediatamente dopo lo stesso. Il torace fetale e quindi il cuore e i grossi vasi sono stati individuati, l'aorta è stata distinta dalla vena cava per l'aspetto della parete, la pulsatilità ed il decorso e la frequenza cardiaca è stata rilevata utilizzando la metodica Doppler ad onda pulsata (**Fig.2.1.2**). Misurazioni multiple sono state effettuate posizionando il volume campione a livello di una camera cardiaca o di aorta, almeno 3 cicli cardiaci sono stati registrati ogni volta e la frequenza cardiaca è stata calcolata utilizzando il pacchetto software in dotazione allo strumento; successivamente è stata calcolata la media matematica di almeno 3 misurazioni ed espressa in battiti per minuto (bpm).

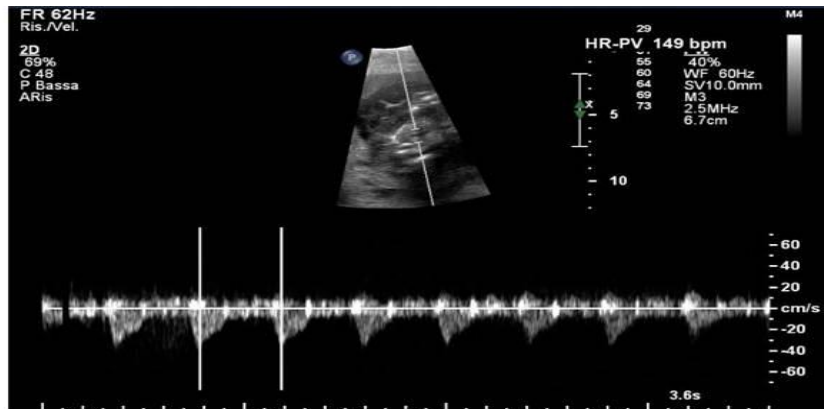


Figura 2.1.2 Misurazione della frequenza cardiaca fetale tramite metodica Doppler ad onda pulsata. In alto è visualizzata l'immagine bidimensionale del torace fetale, cui è sovrapposta la linea di interrogazione con il gate posto in corrispondenza del cuore. La frequenza è calcolata automaticamente in base alla distanza tra due onde sullo spettro Doppler.

2.1.2.4 Esame ecografico con mezzo di contrasto (CEUS)

Sulla base dell'esame bidimensionale è stato selezionato il quadrante addominale da sottoporre ad esame eco-contrastografico (CEUS), in modo che l'area prescelta rispondesse a criteri di visualizzazione rappresentativa e di buona qualità dell'unità utero-placentare. Nel caso dell'esame transrettale al giorno 40 di gestazione la CEUS è stata eseguita a livello della base del corno gravido, in corrispondenza del feto.

L'esame CEUS è stato condotto impiegando un mezzo di contrasto (mdc) ecografico (*SonoVue®*, Bracco Diagnostic, Milano, Italy), sospendendo la polvere liofilizzata in un volume di 5 ml di soluzione fisiologica sterile, seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. La dose di mdc è stata decisa sulla base di prove preliminari condotte prima dell'inizio dello studio (dati non riportati). L'intera dose di 5 ml è stata somministrata tramite iniezione manuale via catetere endovenoso.

Prima dell'inoculazione del mdc, il software eco-contrastografico specifico (*Pulse Inversion Harmonic and Power Modulation combined-*

PMPI) è stato attivato. Questo software consente di ricevere e registrare solamente il segnale proveniente dal mdc, ottimizzando così il rapporto segnale/rumore e riducendo gli artefatti derivati dal tessuto. Per la visualizzazione dell'area utero-placentare è stata impiegata la modalità *dual* che permette di visualizzare affiancate sia l'immagine bidimensionale che quella con il contrasto. I parametri modificabili come indice meccanico, guadagno e compressione sono stati ottimizzati negli studi preliminari e mantenuti costanti per tutti gli esami e l'area focale posizionata in corrispondenza della regione di indagine. Gli esami sono stati registrati in filmati di durata pari a 90 secondi a partire dall'iniezione del bolo e salvati in formato DICOM.

Analisi dei filmati eco-contrastografici

La distribuzione del mdc nella parete uterina è stata analizzata per ciascun filmato sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo.

I filmati sono stati valutati qualitativamente osservando la distribuzione del mdc all'interno della parete placentare.

I filmati CEUS sono poi stati analizzati in modo quantitativo con l'impiego di un software di analisi dedicato (*QLAB Quantification software*, Philips Healthcare). Una regione di interesse (ROI) più ampia possibile è stata delineata manualmente adattandola allo spessore dell'unità utero-placentare e cercando di evitare l'inclusione al suo interno di vasi di calibro maggiore (**Fig. 2.1.3**). La ROI veniva mantenuta nella localizzazione corretta grazie ad uno strumento del programma di analisi ("*Motion Compensation*") e gli artefatti nel segnale dovuti al movimento sono stati corretti manualmente. Il software analizza il segnale all'interno della ROI quantificandone l'intensità media in funzione del tempo, fornendo delle curve di perfusione con aspetto parabolico.

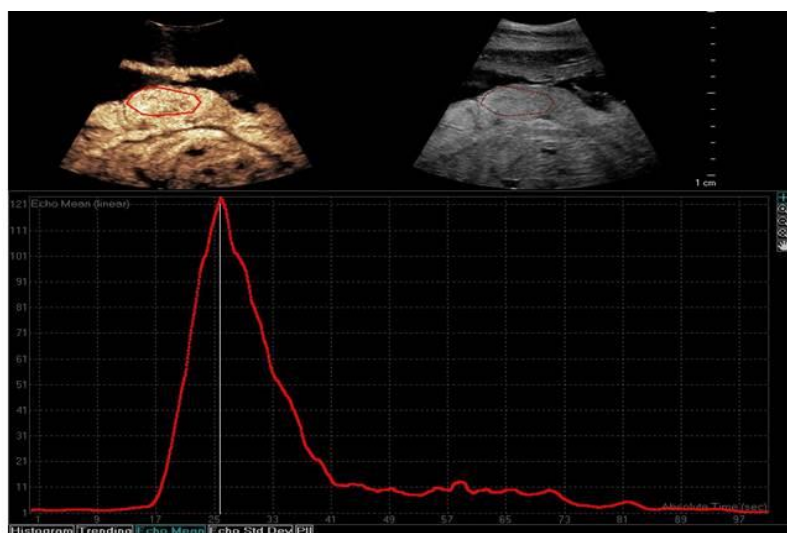


Figura 2.1.3 Quantificazione del segnale del mezzo di contrasto. In alto sono visualizzate, in modalità dual, l'immagine contrastografica e bidimensionale, cui è sovrapposta la ROI (regione di interesse) tracciata manualmente. In basso, sul display, la curva intensità- tempo elaborata dal software.

I dati così ottenuti vengono trasferiti in un foglio di lavoro ed analizzati impiegando un programma di statistica (*GraphPad Prism® 5, versione 5.01*) al fine di misurare le seguenti variabili emodinamiche:

- Intensità del segnale di base (BI), espresso in unità arbitraria (u.a.);
- Tempo al picco dall'iniezione (TPPinj): tempo dall'iniezione del mdc al picco di *enhancement*, espresso in secondi (s);
- Tempo al picco dall'arrivo del mezzo di contrasto (TTPir): calcolato come (TPPinj-AT), espresso in secondi (s);
- Tempo di arrivo (AT): tempo che va dall'iniezione del mdc al momento in cui l'intensità del segnale raggiunge il doppio della linea di base, espresso in secondi (s);
- Intensità del segnale di picco (PI), espresso in unità arbitrarie (u.a.).

In considerazione dei soli due soggetti inclusi nello studio, le variabili emodinamiche CEUS sono state analizzate con una statistica descrittiva

utilizzando un programma commerciale (*Microsoft Excel*) e i risultati ottenuti sono stati espressi come valori singoli.

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Bologna.

2.1.2.5 Esame bidimensionale e Doppler delle arterie uterine

La valutazione delle arterie uterine è stata eseguita contestualmente all'esame eco-contrastografico dell'unità feto-placentare o il più ravvicinato possibile a questo. L'esame è stato eseguito sempre dal medesimo operatore.

Le arterie uterine destra e sinistra sono state valutate in 2D per la misurazione del diametro (D) e per la valutazione del flusso uterino è stato eseguito l'esame Doppler ad onda pulsata (PW) con approccio *per rectum*, utilizzando un ecografo (*SonoSite Micromaxx, WA, USA*) dotato di sonda lineare 10-5MHz ad uso transrettale.

Le arterie sono state individuate nella seguente maniera: orientando la sonda dorsalmente a livello lombare si identifica l'aorta e la si segue caudo-lateralmente fino all'origine dell'arteria ilaca esterna (a.i.e); proseguendo caudalmente, tale vaso dà origine all'arteria circonflessa iliaca profonda (a.c.p.), che ha diametro pari a 6-7 mm e decorre solitamente accompagnata da due vene. L'arteria uterina (a.u) si origina dall'a.iliaca esterna subito dopo l'a.c.p. e poco distalmente passa sopra e vicino a quest'ultimo vaso; è identificabile con certezza in questa finestra in 2D e color-Doppler, circa 2-5 cm distalmente alla sua origine. Tre misurazioni del D sono state ottenute, tracciando la misura con il calibro elettronico, dall'immagine 2D acquisita in questa scansione, (**Fig. 2.1.4**).



Figura 2.1.4 Misurazione del diametro dall'arteria uterina (sinistra in questo caso) dall'immagine bidimensionale. La misura viene eseguita nel punto in cui il vaso passa sopra l'arteria circonflessa iliaca profonda accompagnata dalle due vene (a destra nell'immagine).

L'area di sezione del vaso è stata poi calcolata utilizzando la seguente formula: $A \text{ (cm}^2\text{)} = (D/2)^2 \times \pi$.

Lo spettro PW-Doppler è stato ottenuto allo stesso livello, ponendo il *gate* in corrispondenza e di dimensioni adeguate al lume vasale, mantenendo la correzione d'angolo pari a 0° e ruotando la sonda, fino ad ottenere almeno due onde consecutive uniformi. Le velocità e gli indici Doppler sono stati misurati automaticamente *on-line* dal software dello strumento sul ciclo cardiaco selezionato sullo spettro (**Fig. 2.1.5**).

Tre cicli cardiaci sono stati analizzati, ove possibile; è stata poi calcolata la media delle misurazioni per ciascun parametro considerato ai fini dello studio: velocità di picco sistolico (PSV cm/s), indice di resistenza (IR) ed indice di pulsatilità (IP). Gli indici sono espressi in unità di misura arbitrarie (u.a.).

Le variabili 2D e Doppler sono state analizzate con una statistica descrittiva utilizzando un programma commerciale (*Microsoft Excel*) ed i risultati ottenuti sono stati espressi come valori singoli.

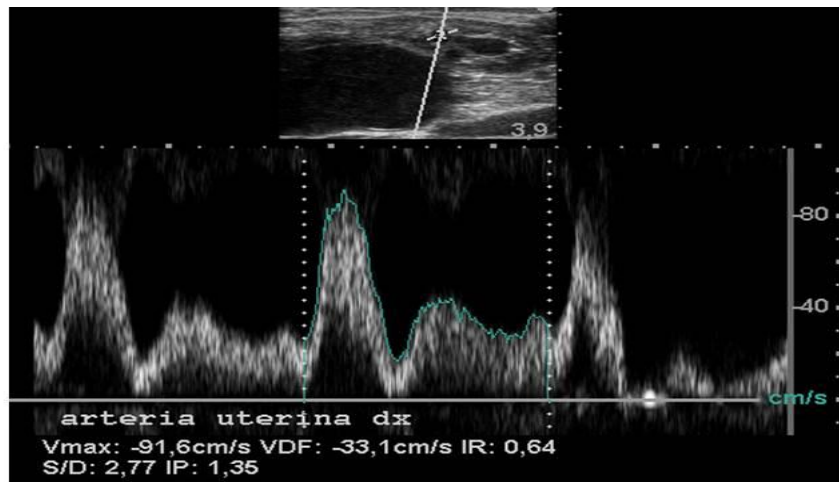


Figura 2.1.5 Calcolo delle velocità e degli indici flussimetrici derivati dall'esame Doppler ad onda pulsata dell'arterie uterine. In alto è visibile l'immagine bidimensionale, cui è sovrapposta la linea di interrogazione con il gate posto in corrispondenza dell'arteria uterina. In basso, sullo spettro Doppler, una volta che si è selezionato il ciclo cardiaco da analizzare il software fornisce automaticamente i valori. Vmax: velocità di picco sistolico (PSV), VDF: velocità diastolica finale, IR: indice di resistenza, S/D: rapporto sistole/diastole, IP: indice di pulsatilità.

2.2 RISULTATI

Entrambe le fattrici hanno partorito un puledro clinicamente sano, a termine della gestazione (328 e 329 giorni) ed in maniera eutocica; gli annessi fetali sono stati espulsi spontaneamente entro 3 h dal parto ed apparivano integri e normali all'esame macroscopico; i puledri hanno assunto la stazione quadrupedale ed hanno assunto il colostro entro gli intervalli di tempo normali, tutti i parametri clinici ed emato-biochimici sono risultati entro i *range* di riferimento normali sia subito dopo il parto che alle successive valutazioni.

Le valutazioni ecografiche in tutte le modalità sono state eseguite a tutti gli intervalli di tempo prestabiliti in entrambe le fattrici. Complessivamente, sono stati eseguiti 9 esami eco-contrastografici e 10 esami Doppler del flusso uterino per ciascuna fattrice, di cui l'ultimo è stato eseguito due giorni prima del parto per la fattrice 1 e 4 giorni prima per la fattrice 2.

2.2.1 Rilievi ecografici bidimensionali

Tutti i dati relativi ai parametri bidimensionali inclusi nel profilo biofisico fetale, valutati al fine di determinare e monitorare la crescita ed il benessere fetale sono risultati per entrambi i soggetti nei limiti della norma durante tutti gli studi ecografici eseguiti nel corso della gravidanza.

In particolare, ai fini di questo studio, si riportano i risultati ottenuti relativamente alla valutazione morfo-metrica dell'unità utero-placentare (Tabella 2.2.1 e 2.2.2) ed alla frequenza cardiaca fetale (Tabella 2.2.3), rilevata prima e dopo l'esame contrastografico.

In base al monitoraggio ecografico risulta che, a livello delle porzioni esaminate, il contatto utero-placentare si è mantenuto completo durante

l'intero corso della gravidanza, non essendo mai state rilevate aree di discontinuità; l'aspetto bidimensionale dell' unità utero-placentare è risultato sempre nei limiti della norma; il corno non gravido, quando visualizzato, appariva con aspetto ispessito ed ripiegato in pliche contrariamente all'aspetto generalmente più disteso ed assottigliato della parete del corno gravido dovuto alla tensione esercitata dal feto.

2.2.1.1 Spessore combinato di utero e placenta (SCUP)

Vengono riportati ed analizzati i risultati relativi alle misurazioni dello spessore combinato utero-placentare (SCUP) eseguite sia livello addominale, per via transcutanea, sia al polo placentare cervicale, per via transrettale, in entrambe le fattrici.

I valori dello SCUP (cm) ottenuti nei due soggetti per ciascuno dei 9 quadranti transaddominali della placenta e la media calcolata per l'insieme dei 9 quadranti ad ogni tempo, sono riportati nella tabella (**Tabella 2.2.1**).

	Giorni di gravidanza							
	90-100	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
<i>SCUP (cm) quadrante addominale</i>								
CdD	0,64	0,66	0,60	0,81	0,72	0,80	1,22	0,62
	nd	0,55	0,63	0,54	0,65	0,63	0,82	1,39
CdM	nd	nd	0,54	0,50	0,53	0,88	1,48	0,64
	nd	0,57	0,78	0,55	0,80	0,88	0,73	1,24
CdS	nd	0,60	0,48	nd	0,50	1,23	1,46	0,68
	nd	0,49	0,83	0,62	0,87	0,90	0,92	1,13
MD	nd	nd	0,76	0,60	0,36	0,58	1,32	0,68
	nd	0,36	nd	0,64	0,70	0,83	0,88	0,70
MM	nd	nd	0,67	0,54	0,44	0,49	1,51	0,56
	nd	0,72	0,44	0,96	0,66	0,90	0,86	1,38
MS	nd	nd	0,55	0,53	0,70	nd	1,07	0,56
	nd	0,48	0,67	0,57	0,82	0,85	0,82	0,94
CrD	nd	0,52	0,50	0,67	0,53	0,61	0,88	0,54
	nd	nd	0,55	0,57	0,84	0,69	0,78	0,93
CrM	nd	nd	0,69	0,44	0,43	0,52	1,63	0,57
	nd	0,77	0,32	nd	0,74	0,84	0,68	0,80
CrS	nd	0,53	nd	0,49	0,53	nd	0,88	0,56
	nd	0,45	0,38	0,95	0,70	0,82	1,00	nd
MEDIA (dev.st)	0,64	0,57(0,06)	0,6(0,1)	0,57(0,12)	0,53(0,12)	0,73(0,26)	1,27(0,28)	0,6(0,05)
	nd	0,55(0,14)	0,58(0,19)	0,68(0,18)	0,75(0,08)	0,81(0,09)	0,83(0,1)	1,11(0,23)

Tabella 2.2.1 Misurazioni dello spessore combinato utero-placenta (SCUP) eseguito a livello dei 9 quadranti addominali della placenta nelle fattrici 1 e 2. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza. Per ciascun quadrante sono riportati i valori relativi alla fattrice 1 (carattere normale) ed alla fattrice 2 (carattere corsivo). Quadranti: craniale destro (CrD), medio-destro (MD), caudale-destro (CdD), craniale-medio (CrM), medio-medio (MM), caudale-medio (CdM), craniale-sinistro (CrS), medio-sinistro (MS), caudale-sinistro (CdS); MEDIA (dev.st): media dei valori di tutti i 9 quadranti per ciascun soggetto e relativa deviazione standard in parentesi; nd: non determinato.

Al tempo 90-100 giorni di gravidanza è stato possibile misurare lo SCUP in maniera corretta a livello di un unico quadrante caudale (CdD) solo nella fattrice 1, a causa della ancora ridotta finestra di visualizzazione dell'unità feto placentare a questa età gestazionale.

Negli studi successivi, in alcuni casi ed in entrambi i soggetti non è stato possibile eseguire tale misurazione a causa della visualizzazione inadeguata dell'unità feto-placentare, principalmente in relazione all'interferenza da contatto da parte del feto.

Dalla tabella si può notare che lo spessore della placenta varia nei diversi quadranti addominali esaminati durante ciascun esame ecografico.

Il valore medio dello SCUP, calcolato complessivamente per i 9 quadranti transaddominali per ciascuno studio, è compreso tra un minimo di 0,53 cm ed un massimo di 1,27 cm per la fattrice 1 e tra un minimo di 0,55 cm ed un massimo di 1,11 cm per la fattrice 2 e risulta tendenzialmente più elevato in valore assoluto nella fattrice 2 rispetto alla 1. L'incremento di tali valori risulta progressivo fin dal VI mese (150-180 giorni) nella fattrice 2 e più importante dall' VIII mese a termine; nella Fattrice 1 tale valore risulta aumentato al X ed XI mese ma torna poi a ridursi a 0,6 cm all'ultimo rilievo ecografico (310-320 giorni). Questo stesso andamento, relativo allo SCUP transaddominale medio rispetto all'età gestazionale, si può riscontrare come tendenza generale, anche analizzando singolarmente i 9 quadranti rispetto al tempo in entrambi i soggetti.

Si noti tuttavia che in alcuni casi sono stati raccolti SCUP con valore sensibilmente inferiore rispetto allo spessore medio relativo ai quadranti od all'età gestazionale per es. nella fattrice 1 a livello di quadrante MD a 241-270 giorni (0,36 cm), nella fattrice 2 a livello di quadrante MD a 150-180 giorni (0,36 cm) e così via. Questi valori sono imputabili ad una sottostima nella misurazione dovuta a schiacciamento da parte del feto.

Come già anticipato, tutti i valori riscontrati sono risultati entro i limiti di riferimento normali per l'età gestazionale dei soggetti.

I valori delle misurazioni dello SCUP, in cm, misurato a livello di polo placentare cervicale, espressi come mediana, valore minimo e valore massimo di misurazioni multiple sono riportati in tabella per entrambe le fattrici (**Tabella 2.2.2**).

	Giorni di gravidanza						
	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
<i>SCUP (cm) polo placentare cervicale</i>							
SCUP med.	0,5	0,49	0,61	0,77	1,27	0,86	1,3
(min-max)	0,41	0,51	0,61	0,75	1,06	0,8	1,2
	(0,25-0,57)	(0,46-0,55)	(0,59-0,63)	(0,64-0,79)		(0,79-0,81)	(0,84-1,1)

Tabella 2.2.2 Misurazioni dello spessore combinato utero-placenta (SCUP) eseguito a livello di polo cervicale della placenta nelle fattrici 1 e 2. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza. Sono riportati i valori dello SCUP (cm) relativi alla fattrice 1 (carattere normale) ed alla fattrice 2 (carattere corsivo). Il valore è espresso come mediana, valore minimo e massimo di misurazioni multiple.

I valori dello SCUP al polo cervicale risultano compresi tra un minimo di 0,49 cm ed un massimo di 1,3 cm per la fattrice 1 e tra un minimo di 0,41 cm ed un massimo di 1,2 cm per la fattrice 2. In entrambi i soggetti, l'andamento dei valori denota un incremento nello spessore dell'unità utero-placentare con l'età gestazionale, anche se in entrambi i casi si nota una minima riduzione di tale parametro al rilievo tra i 310 ed i 320 giorni, seguita nuovamente da un aumento tra 321 e 330 giorni di gravidanza.

La modificazione dello SCUP cervicale in funzione dell'età gestazionale nelle due fattrici è rappresentata nell'istogramma (**Fig. 2.2.1**).

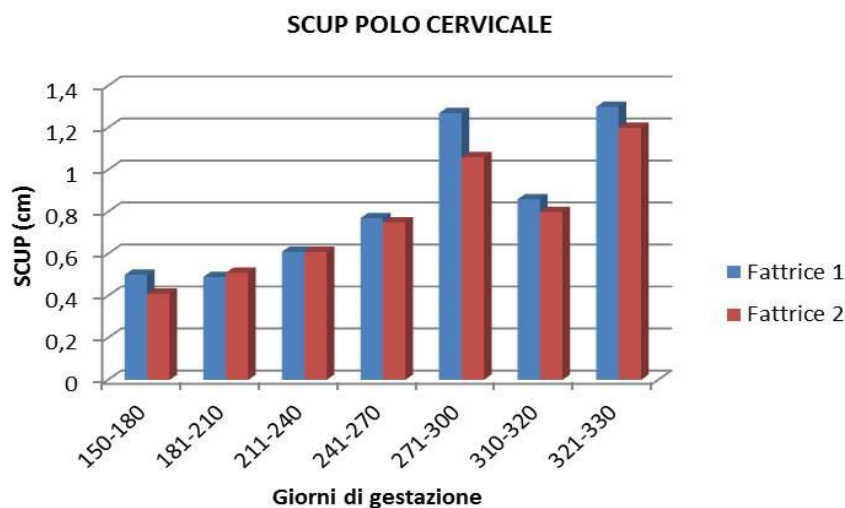


Grafico 2.2.1 Modificazione dello spessore combinato utero-placenta (SCUP) al polo cervicale in funzione dell'età gestazionale nelle fattrici 1 e 2. I valori dello SCUP (cm) rappresentano la media dei valori ottenuti da misurazioni multiple eseguite in ciascun soggetto. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza.

2.2.1.2 Frequenza cardiaca fetale

La frequenza cardiaca fetale, rilevata prima e dopo l'esame eco-contrastografico ed espressa come media di tre rilevazioni è riportata nelle seguente tabella per entrambe le fattrici (**Tabella 2.2.3**).

	Giorni di gravidanza							
	90-100	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
Frequenza cardiaca (bpm)								
pre- CEUS	144	109	132	117	100	103	73	72
	164	109	100	122	126	91	72	76
post-CEUS	157	98	nd	97	91	97	66	81
	148	nd	119	114	100	98	76	76

Tabella 2.2.3 Variazione della frequenza cardiaca fetale (bpm) rilevata tramite Doppler prima e dopo l'esame eco-contrastografico nelle fattrici 1 e 2. Sono riportati i valori dello SCUP (cm) relativi alla fattrice 1 (carattere normale) ed alla fattrice 2 (carattere corsivo). I valori rappresentano la media dei valori ottenuti da misurazioni multiple eseguite in ciascun soggetto. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza.

Per entrambi i soggetti, la frequenza cardiaca fetale è risultata all'interno dei *range* di riferimento normali in base all'età gestazionale ed in progressiva diminuzione con l'avanzare di questa.

In due studi, al tempo 181-210 giorni per la fattrice 1 e 150-180 giorni per la fattrice 2, non è stato possibile rilevare la frequenza cardiaca post-CEUS per mancata visualizzazione del cuore fetale.

Tale parametro, pur presentando una certa variabilità nel corso della durata di ciascuno studio ecografico, non ha mai subito alterazioni ed in particolare riduzioni significative tra i rilievi eseguiti prima e dopo l'esame eco-contrastografico nella fattrice 2. Per quanto riguarda la fattrice 1, pur rilevandosi una minima tendenza alla riduzione della frequenza dopo la valutazione CEUS in tutti gli esami, ad eccezione del primo (tempo 90-100 giorni), i valori rimangono sempre all'interno dei *range* fisiologici per il feto equino relativamente all'età gestazionale.

2.2.2 Rilievi ecocontrastografici (CEUS)

La valutazione qualitativa delle CEUS dell'unità utero-placentare è stata possibile per tutti i 9 studi eco-contrastografici in entrambe le fattrici.

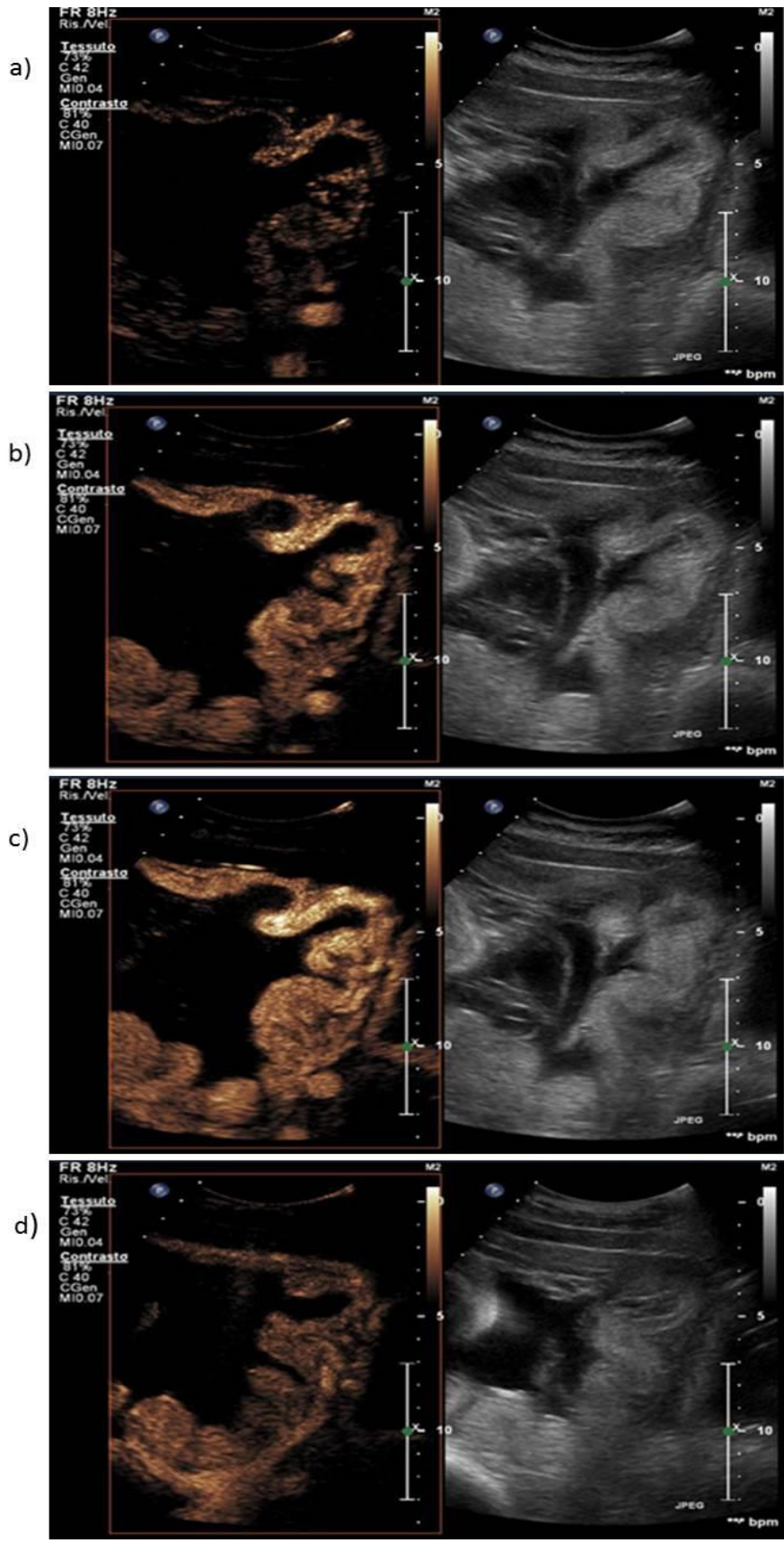
2.2.2.1 Valutazione qualitativa dei filmati CEUS

La presa di contrasto si verifica in direzione materno-fetale, a partire dalla zona più esterna della parete uterina verso la sua superficie di contatto con l'allantocorion.

In alcuni studi, precisamente in 3 nella fattrice 1 ed in 3 nella fattrice 2, è stato possibile visualizzare il segnale delle microbolle arrivare a livello delle arterie endometriali di calibro maggiore, prima di distribuirsi alla microvascolarizzazione dell'endometrio stesso. In pochi casi è stato possibile distinguere nel corso dell'esame vasi di minor calibro che scorrono con andamento tortuoso verso la superficie endometriale.

In tutti gli studi la presa di contrasto a livello di endometrio è simultanea in tutta l'area compresa nell'immagine ed al picco di *enhancement* appare diffusamente omogenea e di intensità soggettivamente diversa, in particolare in dipendenza dello spessore e dello stato più o meno ripiegato della parete stessa. In fase di dilavamento si ha una progressiva perdita di contrasto da parte della parete uterina, che appare anch'essa uniforme ed abbastanza precoce, con il segnale che persiste più a lungo a livello dei vasi di calibro maggiore che corrono alla base dell'endometrio, ove visibili (**Fig. 2.2.2**).

Figura 2.2.2 Esempio di presa di contrasto dell'unità utero-placenta. Le immagini sono presentate come finestre affiancate, con la visualizzazione in scala di grigi a destra e l'immagine contrastografica a sinistra: a) le microbolle sono visibili come segnali iperecogeni a livello dei vasi endometriali ed iniziano a perfondere l'endometrio tramite vasi di piccolo calibro; b) successivamente si ha la presa di contrasto in maniera uniforme dello strato endometriale; c) al picco di *enhancement* il segnale del mezzo di contrasto è diffusamente omogeneo e soggettivamente intenso; d) il dilavamento del mezzo di contrasto dall'endometrio è uniforme, con evidenza persistente dei vasi sub-endometriali di calibro maggiore. Si noti dall'immagine bidimensionale la presenza di alcune parti del feto ed anse di cordone ombelicale che non mostrano presa di contrasto.



Il raffronto con l'immagine bidimensionale, affiancata a quella CEUS, ha permesso di rilevare che il mezzo di contrasto non si distribuisce mai nell'intero spessore dell'unità utero-placentare, rimanendo confinato ad uno strato sul versante materno di questo.

Inoltre, in numerosi studi, alcuni tratti di cordone ombelicale, così come il feto, erano visualizzati insieme all'unità utero-placentare all'interno della finestra d'esame contrastografico: in nessun caso è mai stata rilevata la presenza di microbolle a livello di vene ombelicali, vasi e strutture anatomiche fetali (**Fig. 2.2.3**).

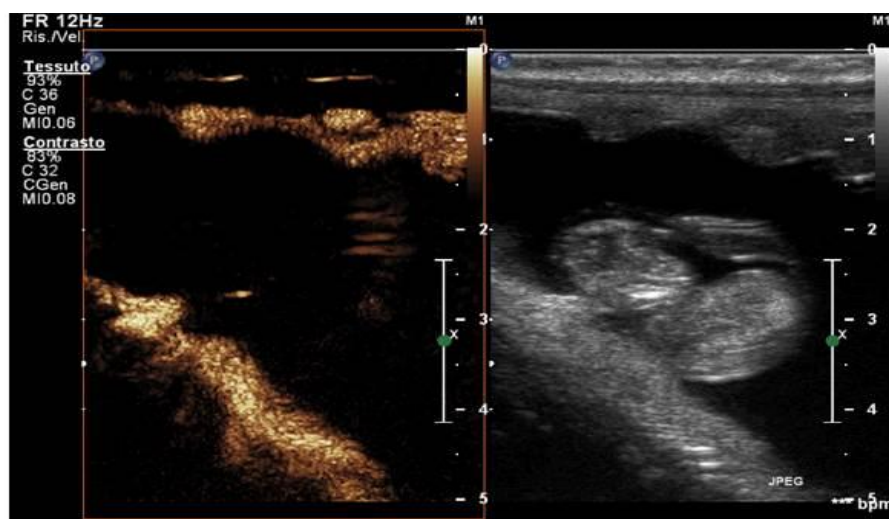


Figura 2.2.3. Presa di contrasto a livello dello strato endometriale dell'unità utero-placenta in una fase precoce della gestazione. Si noti in questa immagine come il mezzo di contrasto non sia rilevato a livello del feto, visualizzato nell'immagine bidimensionale.

2.2.2.2 Valutazione quantitativa dei filmati CEUS

Nella fattrice 1, la valutazione quantitativa delle CEUS eseguite ai vari tempi nel corso della gravidanza non è stata possibile a causa di un'inadeguata visualizzazione dell'unità utero-placentare dovuta ad eccessivi movimenti fetali, che non ha reso possibile il mantenimento della ROI in maniera stabile e continuativa in corrispondenza alla parete uterina.

Nella fattrice 2, la valutazione quantitativa delle CEUS è stata possibile in 8 studi su 9; non è stato possibile analizzare e quindi ricavare le curve intensità/tempo al tempo 181-210 giorni (VII mese), a causa dell'eccessiva interferenza dei movimenti fetali che non hanno consentito il posizionamento e mantenimento della ROI sulla parete uterina per una valutazione affidabile.

I risultati relativi alle variabili emodinamiche di perfusione derivate dalla quantificazione del segnale ottenuto ai vari tempi nel corso della gravidanza della fattrice 2 sono riportati in tabella (**Tabella 2.2.4**).

	Giorni di gravidanza								
	40	90-100	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
BI (u.a.)	1,02	1,00	1,00	nd	1,00	1,20	1,01	1,00	1,20
AT (s)	17,02	17,77	15,44	nd	18,83	22,49	10,48	15,44	14,65
PI (u.a.)	8,82	10,29	13,46	nd	3,34	20,29	32,96	50,80	107,11
TTPinj (s)	24,60	24,27	17,77	nd	21,08	31,98	15,83	20,51	18,12
TTPir (s)	7,58	6,50	2,33	nd	2,25	9,49	5,35	5,07	3,47

Tabella 2.2.4 Variabili emodinamiche di perfusione CEUS in funzione dell'età gestazionale nella fattrice 2. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza. Intensità del segnale di base (BI), Tempo di arrivo (AT): tempo che va dall'iniezione del mezzo di contrasto al momento in cui l'intensità del segnale raggiunge il doppio della linea di base, Tempo al picco dall'iniezione (TTPinj): tempo dall'iniezione al picco di enhancement, Tempo al picco dall'arrivo del mezzo di contrasto (TTPir): calcolato come (TTPinj-AT), Intensità del segnale di picco (PI), s: secondi, u.a.: unità arbitrarie, nd: non determinato.

Osservando la tabella, si può notare che il tempo di arrivo del mezzo di contrasto (**AT**) è compreso indicativamente tra 10 e 22 secondi. Inoltre pur avendo leggere variazioni segue un andamento decrescente con l'avanzare della età gestazionale (**Fig. 2.2.4**).



Figura 2.2.4 Variazione del tempo di arrivo del mezzo di contrasto (AT) in funzione dell'età gestazionale nella fatrice 2. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza. L'analisi non è stata eseguita al tempo 181-210 giorni. u.a.: unità arbitrarie.

L'intensità al picco di *enhancement* (PI) è raggiunto nella maggior parte dei casi tra i 20 ed i 25 secondi dall'inoculazione del mezzo di contrasto. I valori di PI all'avanzare dell'età gestazionale per la fatrice 2 sono rappresentati nel grafico a linee (**Fig. 2.2.5**).

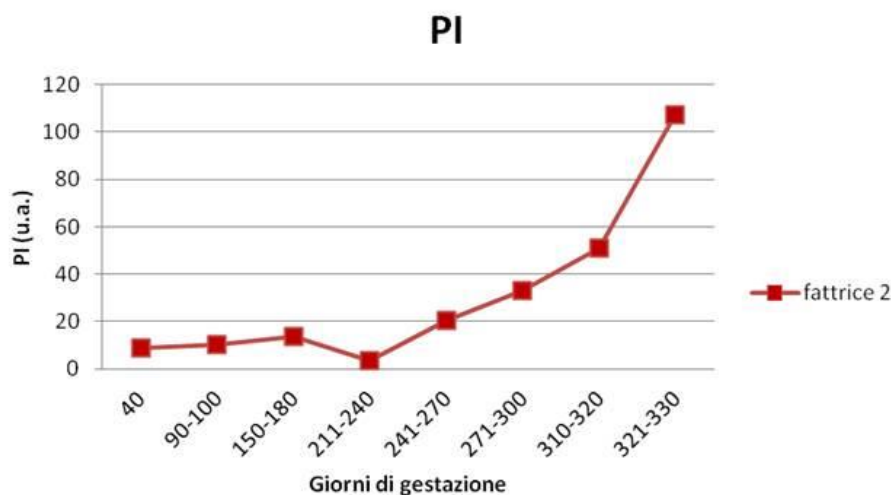


Figura 2.2.5 Variazione dell'intensità del segnale di picco (PI) in funzione dell'età gestazionale nella fatrice 2. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza. L'analisi non è stata eseguita al tempo 181-210 giorni. u.a.: unità arbitrarie.

Come si può notare dal grafico, il PI presenta un andamento crescente fino al tempo 150-180 giorni poi subisce un minimo calo a 210-240 giorni per poi aumentare nuovamente ed in maniera progressiva e rapida fino a termine della gravidanza.

Il tempo al picco dall'iniezione del mdc (**TTPinj**) mostra un andamento in funzione del tempo nel complesso decrescente e concorde con l'andamento dell' AT (**Fig.2.2.6**).

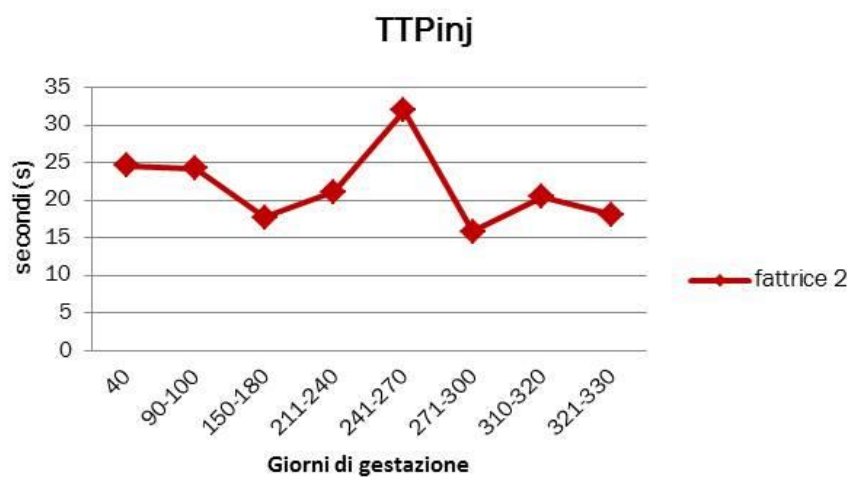


Figura 2.2.6 Variazione del tempo al picco dall'iniezione del mezzo di contrasto (TTPinj) in funzione dell'età gestazionale nella fatrice 2. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza. L'analisi non è stata eseguita al tempo 181-210 giorni. u.a.: unità arbitrarie.

2.2.2.3 Frequenza cardiaca e respiratoria materna

L'esame clinico delle fattrici è risultato entro i limiti della norma durante tutto il corso della gravidanza in entrambi i soggetti. In particolare, la frequenza cardiaca e respiratoria materna sono rimaste all'interno dell'intervallo di normalità e pur presentando un fisiologico aumento con l'avanzare dell'età gestazionale, non hanno mai presentato alterazioni significative nel valore pre- e post- CEUS (valori non riportati).

2.2.3 Rilievi bidimensionali e Doppler delle arterie uterine

L'esame ecografico bidimensionale e Doppler ad onda pulsata delle arterie uterine è stato eseguito a tutti gli intervalli di tempo prestabiliti in entrambe le fattrici. Complessivamente sono stati eseguiti 10 esami per ciascun soggetto nel corso della gravidanza. In tabella sono riportati i valori ottenuti per le variabili misurate e calcolate relative alle arterie uterine di entrambe le fattrici prima e durante la gestazione (**Tabella 2.2.5**).

Nella tabella i valori ottenuti per ciascuna variabile sono stati riportati come valori singoli ed analizzati in maniera descrittiva, utilizzando un programma commerciale (*Microsoft Excel 2010*), al fine di valutare la variazione in funzione dell'età gestazionale di ciascun parametro.

	Giorni di gestazione									
	Pre-FA	40	90-100	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
DIAMETRO ARTERIE UTERINE (cm)										
A.U.SN	0,35 <i>0,26</i>	0,43 <i>0,36</i>	0,63 <i>0,44</i>	0,70 <i>0,64</i>	0,63 <i>0,69</i>	0,78 <i>0,86</i>	0,93 <i>0,85</i>	1,26 <i>0,84</i>	1,28 <i>1,00</i>	1,38 <i>1,04</i>
A.U.DX	0,33 <i>0,29</i>	0,44 <i>0,39</i>	0,53 <i>0,45</i>	0,60 <i>0,65</i>	0,62 <i>0,63</i>	0,72 <i>0,73</i>	0,66 <i>0,94</i>	0,75 <i>1,03</i>	0,86 <i>1,07</i>	0,86 <i>1,05</i>
AREA (cm²)										
A.U.SN	0,10 <i>0,05</i>	0,15 <i>0,10</i>	0,31 <i>0,15</i>	0,38 <i>0,32</i>	0,31 <i>0,38</i>	0,47 <i>0,58</i>	0,67 <i>0,56</i>	1,24 <i>0,55</i>	1,28 <i>0,78</i>	1,49 <i>0,84</i>
A.U.DX	0,09 <i>0,07</i>	0,15 <i>0,12</i>	0,22 <i>0,16</i>	0,28 <i>0,33</i>	0,30 <i>0,31</i>	0,40 <i>0,42</i>	0,34 <i>0,69</i>	0,44 <i>0,83</i>	0,56 <i>0,89</i>	0,58 <i>0,86</i>
PSV (cm/s)										
A.U.SN	29,3 <i>24,9</i>	30,1 <i>58,8</i>	82,9 <i>69,3</i>	107,3 <i>81,4</i>	96,8 <i>80,0</i>	nd <i>82,2</i>	123,5 <i>100,1</i>	152,7 <i>99,9</i>	151,4 <i>100,5</i>	192,0 <i>134,4</i>
A.U.DX	27,0 <i>24,1</i>	26,0 <i>41,9</i>	70,3 <i>49,6</i>	78,2 <i>108,8</i>	84,8 <i>89,9</i>	nd <i>94,6</i>	75,6 <i>94,5</i>	78,9 <i>140,8</i>	104,8 <i>134,8</i>	102,6 <i>134,0</i>
IR (u.a.)										
A.U.SN	0,71 <i>nd</i>	0,72 <i>0,61</i>	0,61 <i>0,67</i>	0,49 <i>0,53</i>	0,46 <i>0,26</i>	nd <i>0,42</i>	0,41 <i>0,43</i>	0,37 <i>0,53</i>	0,36 <i>0,56</i>	0,37 <i>0,45</i>
A.U.DX	0,78 <i>nd</i>	0,83 <i>0,60</i>	0,66 <i>0,45</i>	0,52 <i>0,49</i>	0,45 <i>0,42</i>	nd <i>0,43</i>	0,44 <i>0,43</i>	0,39 <i>0,45</i>	0,42 <i>0,46</i>	0,45 <i>0,37</i>
IP (u.a.)										
A.U.SN	1,59 <i>nd</i>	1,5 <i>0,62</i>	1,16 <i>0,75</i>	0,76 <i>0,78</i>	0,74 <i>0,49</i>	nd <i>0,65</i>	0,67 <i>0,67</i>	0,51 <i>0,80</i>	0,44 <i>1,10</i>	0,24 <i>0,68</i>
A.U.DX	1,69 <i>nd</i>	1,88 <i>1,17</i>	1,26 <i>0,67</i>	0,96 <i>0,78</i>	0,65 <i>0,64</i>	nd <i>0,59</i>	0,59 <i>0,62</i>	0,49 <i>0,70</i>	0,64 <i>0,68</i>	0,74 <i>0,51</i>

Tabella 2.2.5 Misurazioni del diametro, dell'area e degli indici Doppler delle arterie uterine nelle fattrici 1 e 2. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione. Per ciascuna variabile sono riportati i valori relativi alla fattrice 1 (carattere normale) ed alla fattrice 2 (carattere corsivo). PSV (cm/s): velocità di picco sistolico, IR : indice di resistenza, IP: indice di pulsatilità, A.U.SN: arteria uterina sinistra, A.U.DX: arteria uterina destra, nd: non determinato, u.a.: unità arbitrarie.

La misurazione del diametro del vaso è stata ottenuta in tutte le valutazioni ecografiche eseguite ed in entrambe le fattrici. Per quanto riguarda l'esame Doppler, in due casi non è stato possibile eseguire la valutazione completa delle variabili (PSV, IR e IP) a causa dell'impossibilità di ottenere uno spettro di qualità adeguata ai fini dell'analisi: al tempo 211-240 giorni per la fattrice 1 ed al tempo pre-FA per la fattrice 2, ove solo la velocità massima (PSV) è stata misurata manualmente.

Ai fini dello studio le variabili valutate sono state il diametro del vaso (D), la velocità di picco sistolico (PSV) e l'indice di resistenza (IR). Nei grafici viene riportato l'andamento di tali variabili in funzione del tempo, considerando per ciascuna fattrice la media dei valori ottenuti dall'arteria uterina ipsi- e controlaterale al corno gravido.

Il D del vaso aumenta progressivamente nel corso della gravidanza bilateralmente ed in entrambe le fattrici di circa 3-4 volte rispetto a prima della fecondazione (**Fig. 2.2.7**).

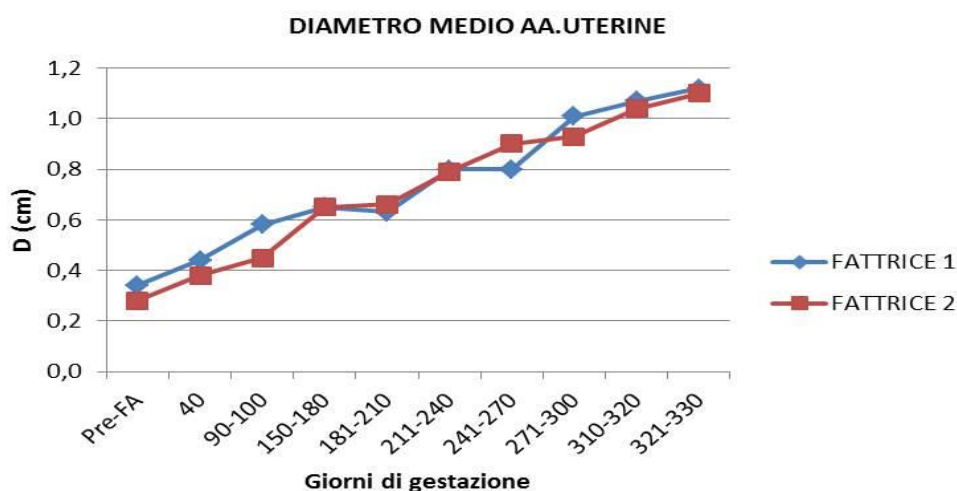


Grafico 2.2.7 Modificazione del diametro (D) delle arterie uterine in funzione dell'età gestazionale nelle fattrici 1 e 2. I valori del diametro rappresentano la media dei valori ottenuti per l'arteria uterina ipsi- e controlaterale al corno gravido in ciascun soggetto. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione.

Tuttavia nel caso della fattrice 1 si nota un aumento del D dell'arteria uterina sinistra, ipsilaterale al corno gravido, di maggior entità rispetto al vaso di destra (vedi Tabella 2.2.5).

Come atteso, con il D aumenta in modo esponenziale l'area di sezione.

La PSV aumenta nel corso della gravidanza bilateralmente ed in entrambe le fattrici (**Fig. 2.2.8**); tuttavia anche in questo caso si nota un incremento maggiore nel caso dell'arteria ipsilaterale al corno gravido nella fattrice 1 (a.u.sinistra) ed in minor misura nella fattrice 2 (a.u.destra) (vedi Tabella 2.2.5). In relazione al valore assoluto ottenuto per la PSV, va notato che questo risulta sistematicamente sottostimato rispetto ai valori riportati in altri studi, probabilmente a causa della tecnica d'esame utilizzata.

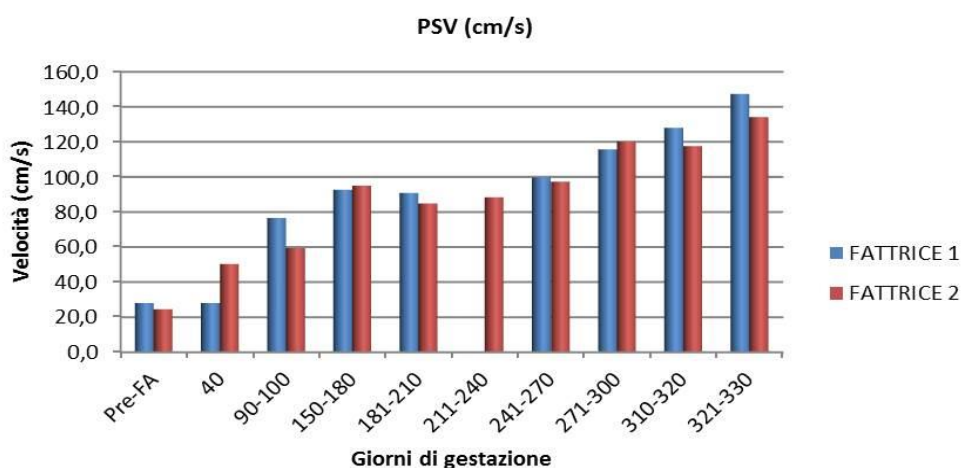


Grafico 2.2.8 Andamento della velocità di picco sistolico (PSV) delle arterie uterine in funzione dell'età gestazionale nelle fattrici 1 e 2. I valori della velocità rappresentano la media dei valori ottenuti per l'arteria uterina ipsi- e controlaterale al corno gravido in ciascun soggetto. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione. L'analisi non è stata eseguita al tempo 211-240 giorni nella fattrice 1.

L'IR diminuisce nel corso della gravidanza bilateralmente ed in entrambe le fattrici: tale riduzione avviene sostanzialmente dal tempo 40 giorni al tempo 150-180 giorni, mentre successivamente il valore dell'IR rimane pressochè inalterato (**Fig. 2.2.9**).

Tale andamento risulta sovrapponibile per le arterie destra e sinistra in entrambi i soggetti, tuttavia nel caso della fattrice 2, dalla II metà di gravidanza (181-210 giorni), i valori di IR pur rimanendo bassi mostrano un andamento un pò più variabile, in particolare per l'arteria uterina sinistra, ovvero controlaterale al corno gravido (vedi Tabella 2.2.5).

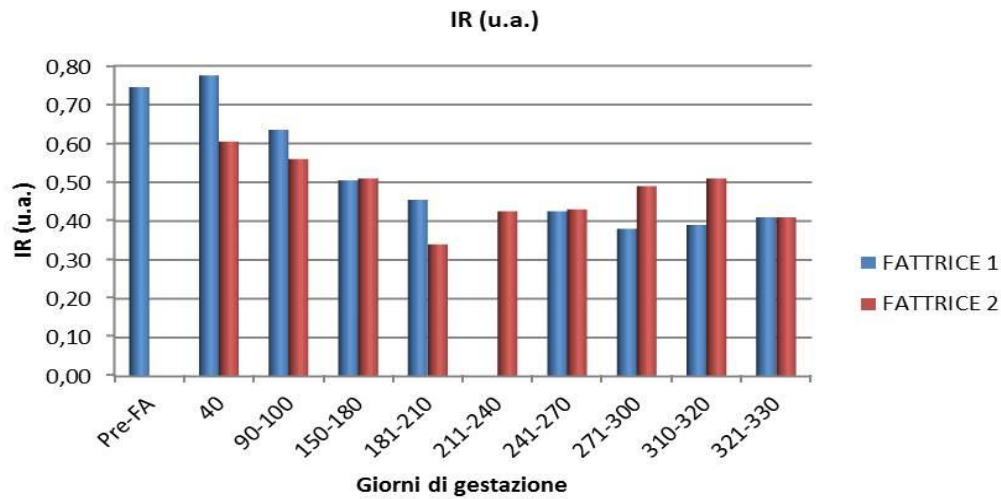


Grafico 2.2.9 Andamento dell'indice di resistenza (IR) delle arterie uterine in funzione dell'età gestazionale nelle fattrici 1 e 2. I valori dell'IR rappresentano la media dei valori ottenuti per l'arteria uterina ipsi- e controlaterale al corno gravido in ciascun soggetto. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame è riportato come intervallo in giorni di gravidanza; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione. L'analisi non è stata eseguita al tempo pre-FA e 211-240 giorni nella fattrice 1. u.a.: unità arbitrarie.

2.3 DISCUSSIONE

L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) è una tecnica non invasiva che permette di migliorare il segnale del flusso vascolare in vari organi e, a differenza delle altre tecniche di *imaging*, di valutare la microperfusionione.

In medicina umana e veterinaria dei piccoli animali, la CEUS viene ampiamente utilizzata da alcuni anni in vari campi, principalmente per la valutazione della vascolarizzazione tumorale in particolare a carico di fegato, reni e milza (Gaschen L. et al., 2011; Hears H. et al., 2010; Haers H. et al., 2013; Kutara K. et al., 2006; Leinonem MR. Et al., 2010; Namakura K. et al., 2010; Ohlerth S. et al., 2007; Waller KR. et al., 2007). Applicazioni più recenti in campo ostetrico hanno dimostrato la possibilità di monitorare e quantificare la perfusione utero-placentare nella donna, nei primati e nel ratto (Arthuis CJ. et al., 2013; Barth WH. et al., 2006; Hua X. et al., 2009; Ordén MR et al., 2000; Ragavendra N. e Tarantal AF., 2001; Schmiedl UP. et al., 1998; Zhou YJ. et al., 2013).

Attualmente non sono presenti in letteratura studi sull'utilizzo della CEUS in medicina equina.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di utilizzare per la prima volta la CEUS per la valutazione della perfusione utero-placentare nel corso della gravidanza in due fattrici sane di razza Trottatore, associando tale valutazione all'ecografia bidimensionale per il monitoraggio dell'unità fetoplacentare e Doppler per l'esame del flusso uterino.

Ad oggi l'ecografia rimane la tecnica più utilizzata per il monitoraggio della gravidanza nella fattrice e, sulla base della tecnica bidimensionale convenzionale con approccio transrettale e transaddominale, sono state

monitorate la crescita ed il benessere dell'unità feto-placentare nell'intero corso dello studio.

Sulla base dell'esame bidimensionale si può affermare che l'aspetto ecografico dell'unità feto-placentare è risultato normale per tutto il corso della gravidanza in entrambi i soggetti. Il contatto dell'unità utero-placentare è stato mantenuto per tutta la durata della gravidanza, non essendo mai state riscontrate zone di discontinuità nelle aree valutate. Lo spessore combinato utero-placentare (SCUP) è stato valutato secondo la metodica standard esaminando il polo cervicale per via transrettale e 9 quadranti per via transaddominale, come già eseguito nel 2007 da Bucca et al. Tutti i valori sono risultati all'interno del *range* di riferimento presenti in bibliografia (Bucca S. et al., 2005; Bucca S. et al., 2007; Renaudin CD. et al., 1997) ed evidenziano un complessivo andamento in crescita dello spessore dell'unità utero-placentare con l'avanzare dell'età gestazionale. Non sempre è stato possibile effettuare la misurazione in tutti i quadranti perché la presenza od il movimento del feto ha influenzato lo spessore reale dell'unità feto-placentare; alcuni dati con valore superiore o inferiore rispetto alla media dei valori relativamente all'età gestazionale possono essere pertanto spiegati in questo senso.

La frequenza cardiaca fetale, rilevata prima e dopo l'esame ecocontrastografico, è sempre risultata nei *range* di normalità presenti in bibliografia e lievi alterazioni in aumento o riduzione del valore stesso possono essere spiegati con le diverse fasi di attività fetale o con l'influenza da parte del sistema nervoso autonomo materno sul feto (Bucca S. et al., 2005; Bucca S., 2011; Renaudin CD. et al., 1997; Troedsson M. e Sage AM., 2001). In un unico caso non è stato possibile effettuare la misurazione post-CEUS per la posizione assunta dal feto che non consentiva un'adeguata visualizzazione dell'area cardiaca.

L'ecografia bidimensionale veniva eseguita preliminarmente all'esame CEUS, consentendo di identificare l'area della parete uterina migliore ai fini della valutazione della perfusione uterina con mezzo di contrasto.

Non essendo presenti in letteratura dati relativi ad un protocollo per l'esame ecocontrastografico nella specie equina, per questo studio sono stati utilizzati la tecnica di esame e di analisi standardizzata per l'applicazione diagnostica della CEUS nei piccoli animali presso il nostro Servizio di Diagnostica per Immagini, conformi ai criteri della *European Federation of Societies for Ultrasound In Medicine and Biology* (EFSUMB) (Claudon M. et al., 2008). La scelta del dosaggio è stata ottenuta empiricamente, tramite prove preliminari eseguite sull'utero non gravido, fino a determinare la dose sufficiente per ottenere un segnale di buona qualità. La dose di 5 ml si è dimostrata efficace per consentire la valutazione del microcircolo endometriale e l'ottenimento di curve intensità-tempo qualitativamente adeguate durante tutto il corso della gravidanza. Si può notare come tale dose sia relativamente bassa, considerando l'enorme differenza di mole della specie equina rispetto all'uomo, per cui il foglietto illustrativo del *SonoVue*® riporta una dose usuale pari a 2-2,4 ml. Anche l'inoculazione del mezzo di contrasto in bolo si è rivelata efficace ai fini dello studio, utilizzando la vena giugulare in quanto sede comune per l'inoculazione sistemica di soluzioni o farmaci nel cavallo, invece che la vena cefalica del braccio utilizzata nei piccoli animali.

L'esame ecocontrastografico si è dimostrato utile nel valutare il grado e la modalità di vascolarizzazione della componente materna dell'unità utero-placentare nella fattrice.

Il mezzo di contrasto è visualizzabile precocemente a livello dei vasi sub-endometriali di calibro maggiore, per poi distribuirsi in maniera rapida e con *enhancement* omogeneo ed intenso alla fitta rete microvascolare

dell'endometrio; il dilavamento della parete avviene poi in maniera altrettanto omogenea e relativamente rapida, con perdita di contrasto, in ultimo, nuovamente dai vasi di maggior calibro, che corrono più perifericamente rispetto allo strato perfuso. Questo pattern di presa di contrasto, distribuzione e dilavamento si è rivelato costante in tutti gli esami CEUS eseguiti ai vari intervalli di tempo nel corso della gravidanza in entrambe le fattrici.

Questa modalità di perfusione potrebbe trovare una spiegazione anatomo-funzionale nella architettura microvascolare dell'utero gravido.

Nella fattrice la placenta è diffusa, microcotiledonaria ed epiteliocoriale (Morresey PR., 2011). I vasi sanguigni placentari sono orientati in modo che il flusso materno scorra in controcorrente al flusso fetale nella rete capillare. Rispecchiando l'architettura del microcotiledone, la microcaruncola materna riceve il sangue arterioso tramite branche dei vasi subendometriali, da cui originano lunghe e rettilinee arterie microcaruncolari con direzione fetale; queste si ramificano in una rete capillare sulla superficie della microcaruncola, prima di essere drenate confluendo in un'unica vena microcaruncolare alla base della stessa, con decorso altrettanto lineare. Per favorire gli scambi transplacentari a livello di letto capillare, i vasi che lo alimentano, sia dal lato materno che fetale, devono scorrere infatti nel modo più rettilineo possibile, garantendo la minor distanza dai vasi maggiori ai capillari della rete di scambio e la maggior efficienza della stessa (Abd-Elnaeim M. et al., 2006).

Pur essendo difficilmente attuabile un confronto con altre specie quali il ratto e con la donna, a causa delle differenze strutturali della placenta emocoriale rispetto a quella epiteliocoriale della fattrice, in questo lavoro si possono ritrovare alcuni elementi comuni a quanto dimostrato in altri studi:

il riscontro di una sequenza temporale dell'*enhancement* dai vasi uterini di maggior calibro alla microvascolarizzazione utero-placentare (lo spazio intervilloso nella placenta emocoriale), la distribuzione omogenea delle microbolle e la relativa rapidità della perdita di contrasto a questo livello, mentre la fase di presa di contrasto risulterebbe più lenta (Schmiedl UP. et al., 1998; Arthuis CJ. et al., 2013; Zhou YJ. et al., 2013). Anche in questi casi, il pattern di microperfusion evidenziato dalla CEUS sembra trovare un forte riscontro anatomo-funzionale nella organizzazione vascolare utero-placentare (Zhou YJ. et al., 2013).

La valutazione quantitativa delle variabili emodinamiche, seppur possibile nel caso di una sola fattrice (fattrice 2), ha permesso di oggettivare le modificazioni della perfusione uterina durante la gravidanza. In accordo con gli studi bibliografici precedentemente discussi, il picco di *enhancement* (PI) presenta un progressivo incremento all'avanzare dell'età gestazionale, con andamento in crescita più evidente nel corso degli ultimi mesi. Per quanto riguarda le tempistiche, si può notare che il tempo di arrivo delle microbolle (AT) ed il tempo al picco di *enhancement* dall'iniezione del mezzo di contrasto (TTPinj) hanno un andamento complessivo in diminuzione, dalle prime alle ultime fasi della gravidanza.

Tale rilievo potrebbe trovare giustificazione nel progressivo adattamento vascolare verso una circolazione utero-placentare a bassa resistenza ed alto flusso ematico, similmente a quanto avviene nella donna e nel ratto e compatibilmente con quanto indicato dai rilievi flussimetrici Doppler nella fattrice gravida. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che la resistenza a livello di arterie uterine diminuisce mentre aumentano il diametro ed il flusso con l'avanzare della gravidanza (Bollwein H. et al., 2002; Bollwein H. et al., 2003; Bollwein H. et al., 2004; Ousey JC. et al., 2012).

In accordo con la letteratura, anche nel nostro lavoro è stato osservato che il diametro (D) delle arterie uterine e la velocità di picco sistolico (PSV) aumentano progressivamente nel corso della gravidanza, mentre l'indice di resistenza (IR) diminuisce, in particolare nella prima metà della stessa. Tale andamento è concorde per entrambe le fattrici e senza sostanziali differenze tra le arterie ipsi- e controlaterali al corno gravido, ad eccezione del diametro e, nella nostra fattrice 1, del PSV. La differenza nell'aumento del diametro del vaso ipsi- e controlaterale tra le due fattrici è difficile da spiegare, in maniera speculativa si potrebbe imputare ad una possibile precedente gravidanza nella stessa sede per la fattrice 1 (corno sinistro) e nella sede controlaterale nella 2 (corno sinistro).

Nonostante le velocità dell'onda siano sottostimate in termini di valore assoluto, probabilmente a causa di limiti tecnici, quali l'utilizzo di una sonda lineare e di una scansione sostanzialmente trasversale del vaso mantenendo la correzione d'angolo pari a 0° , l'IR, essendo un rapporto tra velocità, non risente di questo errore ed è da considerarsi una stima affidabile.

Nella fattrice, tra la fecondazione ed il tempo 40 giorni di gravidanza la vescicola embrionale aumenta lentamente dimensione e l'allantocorion è solo parzialmente sviluppato (Allen WR. e Stewart F., 2001). Durante questa fase, il flusso uterino (BFV) aumenta lievemente mentre il valore dell'IR rimane elevato, con alcuni spettri d'onda con assenza di flusso diastolico precoce, ad indicare alta impedenza vascolare uterina, analogamente alla fattrice non gravida (Bollwein H. et al., 1998).

Tra il tempo 40 e 150-180 giorni, quindi nella prima metà della gravidanza, c'è un sostanziale declino dell'IR, che coincide con la fase di intensa angiogenesi e notevole espansione dell'allantocorion. I microvilli incipienti si sviluppano in microcotiledoni altamente vascolarizzati da una

rete capillare complessa e ramificata e questi si interdigitano con l'endometrio su tutta la superficie uterina (Allen WR. e Stewart F., 2001). La diminuzione dell'IR è accompagnata da un importante aumento del BFV, a supportare la crescente richiesta metabolica dei tessuti feto-placentari.

Durante la seconda metà della gravidanza, l'IR si modifica poco nella fattrice. Sebbene i microcotiledoni placentari continuino a crescere, con il progressivo allungamento e ramificazione dei capillari, questi divengono altresì più sottili o appiattiti; quindi l'impedenza vascolare dei tessuti utero-placentari rimane relativamente bassa (MacDonald AA. et al., 2000; Abd-Elnaeim M. et al., 2006). Per contro, il volume del flusso ematico a livello di arterie uterine continua ad aumentare nel corso della gravidanza (Ousey JC. et al., 2012). L'aumento dell'apporto ematico ai tessuti utero-placentari è influenzato da vari fattori oltre alla impedenza vascolare. Questi includono il flusso in contro-corrente tra i capillari materni e fetali, la diminuzione della distanza di perfusione tra di essi ed una serie di modificazioni cardio-circolatorie fetali ed anche materne, dal cui versante si ha una redistribuzione del flusso ematico degli altri tessuti verso l'utero gravido (Samuel CA. et al., 1975; Fowden AL. et al., 2000; Abd-Elnaeim M. et al., 2006).

Durante le ultime fasi della gestazione (dal giorno 210 a termine) il flusso ematico totale aumenta di circa 3 volte e questo aumento si accompagnerebbe all'aumento di 3-4 volte del peso corporeo del feto che avverrebbe nello stesso periodo (Ousey JC. et al., 2012).

In questo studio non è stato calcolato il volume del flusso ematico uterino (BFV) sulla base dell'area del vaso e degli indici Doppler; questo dato avrebbe fornito un'ulteriore interessante elemento di confronto con i rilievi ecocontrastografici quantitativi ottenuti in una fattrice.

Uno degli scopi di questo lavoro preliminare era di valutare l'effetto dell'utilizzo del mezzo di contrasto sul benessere materno e fetale nella fattrice.

Ad oggi, la sicurezza della CEUS, in particolare per il suo utilizzo in gravidanza, è ancora oggetto di studio a causa del potenziale rischio di danno tissutale dovuto allo stesso meccanismo fisico di funzionamento delle microbolle (Claudon M. et al., 2008); tuttavia sempre più dati sperimentali pongono a favore di un impiego sicuro della metodica (Xua H. et al., 2009; Arthuis CJ. et al., 2013).

In accordo con studi condotti nella donna e negli animali (Orden MR. et al., 1999; Orden MR. et al., 2000; Ragavendra N. e Tarantal AF., 2001; Schmiedl UP. et al., 1998), nel presente lavoro non sono stati rilevati effetti dannosi o di stress a carico della fattrice o del feto. Infatti tutti gli esami clinici delle due fattrici, così come i parametri vitali rilevati dopo l'esame CEUS, sono rimasti nel *range* di normalità per tutta la durata della gestazione e la gravidanza è stata portata a termine in maniera fisiologica.

Per quanto riguarda il feto, tale conclusione sarebbe supportata dai seguenti elementi:

- entrambe le fattrici hanno partorito un puledro clinicamente sano;
- il monitoraggio dei parametri di crescita e benessere feto-placentare (profilo biofisico fetale) convenzionalmente riconosciuti ha sempre fornito risultati all'interno dell'intervallo di normalità in base all'età gestazionale, come già precedentemente discusso, con riferimento, in particolare, al rilievo della frequenza cardiaca pre- e post- CEUS;
- l'andamento in funzione del tempo dei parametri 2D e flussimetrici Doppler delle arterie uterine è risultato concorde con quanto riportato in letteratura come pattern di normalità in base all'età gestazionale;

- gli annessi placentari presentavano aspetto normale all'esame macroscopico.

Inoltre, sulla base della valutazione qualitativa degli esami CEUS, si può affermare che il mezzo di contrasto non raggiunge mai le vene ombelicali nè il feto.

In accordo con studi bibliografici (Arthuis CJ. et al., 2013), questo rilievo consentirebbe di concludere che le microbolle non attraversano la barriera placentare; in effetti, presentando proprietà reologiche simili ai globuli rossi, esse rimarrebbero totalmente all'interno dello spazio vascolare e Xua et al., nel 2009, hanno dimostrato che non alterano la permeabilità della placenta stessa, oltre a non provocarne alterazioni istologicamente rilevabili (Xua H. et al., 2009).

Questo lavoro presenta una serie di limiti che devono essere discussi. Innanzitutto il limite in termini di riproducibilità e validazione dovuto all'inclusione di due soli soggetti nello studio.

La finestra ecografica da sottoporre ad esame ecocontrastografico è stata selezionata cercando di avere un'immagine bidimensionale dell'area di parete uterina di buona qualità e rappresentatività ed in cui l'interferenza fetale fosse la minore possibile. Tuttavia uno dei limiti dello studio è rappresentato proprio dai movimenti della parturiente e soprattutto del feto che, ripercuotendosi sul grado di tensione e movimento della parete uterina, ha inficiato la possibilità di analizzare dal punto di vista quantitativo molte CEUS. In particolare non è stato possibile ottenere, nel caso di una parturiente, una valutazione affidabile delle variabili emodinamiche CEUS nel corso della gravidanza, avendo a disposizione analisi accurate solo di un numero limitato di esami. Infatti, oltre al movimento che non consentiva il permanente ancoraggio della ROI alla parete uterina con conseguente

produzione di eccessivo segnale artefattuale, il diverso spessore e grado di ripiegamento della parete produceva un'inevitabile differenza nell'intensità di segnale dovuta alla differente densità e volume della microvascolarizzazione inclusa nella regione di analisi e questo non ha consentito di ottenere dati quantitativi che fossero confrontabili nel tempo.

A questo proposito va ricordato che studi ecocontrastografici condotti su altre specie, quali primati ed animali da laboratorio, sono stati eseguiti su soggetti in anestesia generale (Arthuis CJ. et al., 2013; Barth WH. et al., 2006; Hua X. et al., 2009; Ragavendraa N. e Tarantal S., 2001; Schmiedl UP. et al., 1998; Zhou YJ. et al., 2013), mentre nel nostro lavoro si è scelto di evitare qualsiasi sedazione per non influenzare in alcun modo i parametri emodinamici e vitali del feto e della fattrice.

Un altro importante limite della metodica da tenere in considerazione è rappresentata dal fatto che, sia la ROI, per quanto riguarda le valutazioni quantitative, sia il quadrante addominale sottoposto a CEUS, costituiscono solo una piccola porzione rispetto all'estensione della superficie utero-placentare in gravidanza avanzata e potrebbero non essere necessariamente rappresentativi dell'insieme, soprattutto in caso di alterazioni fisiopatologiche focali o comunque non diffuse a tutta la parete uterina. Questa limitazione ovviamente non è specifica dell'esame ecocontrastografico, ma di tutte le valutazioni ecografiche della placenta equina.

Va infine sottolineato il fatto che la tecnica CEUS richiede una dotazione strumentale avanzata e software dedicati, non disponibili per la maggior parte degli operatori nel campo della riproduzione equina.

Sulla base del presente lavoro possiamo concludere che la CEUS è una metodica non invasiva, applicabile e potenzialmente utile nella valutazione della microperfusionione dell'utero gravido nella fattrice.

Ulteriori studi, con un numero statisticamente significativo di soggetti, saranno necessari per la validazione della tecnica e per dimostrarne la riproducibilità ed il valore diagnostico; inoltre, sarà necessario confermare il pattern fisiologico di microperfusione uterina, preliminarmente osservato in questo lavoro, al fine di una futura possibile applicazione nel riconoscimento e differenziazione di condizioni patologiche della microvascolarizzazione.

A questo proposito bisogna ricordare che l'analisi Doppler delle arterie uterine e dei vasi ombelicali (Bollwein H. et al., 2002; Bollwein H. et al., 2003; Bollwein H. et al., 2004; McGladdery AL. et al., 1993; Ousey JC. et al., 2012) nella donna come nella fattrice ed in altre specie animali, pur essendo uno strumento utile per il riconoscimento di situazioni di compromissione del circolo materno-fetale, offre una misura indiretta dell'impedenza vascolare e non può essere usata per quantificare la perfusione a livello utero-placentare.

In conclusione, la CEUS potrebbe rivelarsi particolarmente utile ed applicabile, se impiegata in associazione alla ecografia bidimensionale e Doppler convenzionale, nella valutazione oggettiva e nella diagnosi dei disturbi placentari e delle modificazioni degenerative endometriali, in particolare nella struttura del letto capillare, che inficiano l'estensione e l'efficienza del contatto materno-fetale, influenzando la crescita del feto.

BIBLIOGRAFIA

Abd-Elnaeim M., Leiser R., Allen WR.
Structural and haematological aspects of the equine placenta in mid-pregnancy. *Proceeding of a workshop on Embryonic and Fetal Nutrition* 2003, Havemeyer Foundation monograph series **10**: 39-42.

Abd-Elnaeim M., Leiser R., Wilsher S., Allen WR.
Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta* 2006, **27**: 1103–1113.

Abramowicz JS., Sheiner E.
Ultrasound of the placenta: A systematic approach. Part II: functional assessment (Doppler). *Placenta* 2008, **29**: 921-929.

Adams-Brendemuehl C., Pipers FS.
Antepartum evaluations of the equine fetus. *Journal of Reproduction and Fertility* Suppl. 1987, **35**: 565-573.

Allen KA., Stone LR.
Equine diagnostic ultrasonography: equipment selection and use. *Compendium on Continuing Education Practicing Veterinarian* 1990, **12**: 1307–131.

Allen WR. and Stewart F.
Equine placentation. *Reproduction & Fertility Development* 2001, **13**: 623-634.

Allen WR., Wilsher S.
A review of implantation and early placentation in the mare. *Placenta* 2009, **30**: 1005-1015.

Arthuis CJ., Novell A., Escoffre JM., Patat F., Bouakaz A., Perrotin F.
New insights into uteroplacental perfusion: quantitative analysis using Doppler and contrast- enhanced ultrasound imaging. *Placenta* 2013, **34**: 424-431.

Bailey CS., Sper RB., Schewmaker JL., Buchanan CN., Beachler TM., Pozor MA., Whitacre MD.

Uterine artery blood flow remains unchanged in pregnant mares in response to short term administration of pentoxifylline. *Theriogenology* 2012, **77**: 430-436.

Barone R.

Apparecchio genitale femminile. In: Barone R. *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, Vol .IV, Bologna, Ed. Edagricole; 2003: 223-364.

Barth WH., McCurnin DC., Dee Carey K., Hankins GDV.

Contrast sonography, video densitometry and Intervillous blood flow: a pilot project. *Placenta* 2006, **27**: 719–726.

Betros CL., McKeever KH., Kearns CF., Malinowski K.

Effects of ageing and training on maximal heart rate VO_2 max. *Equine Veterinary Journal* 2002, Suppl. **34**: 100-105.

Blanco PG., Tortora M., Rodriguez R., Arias DO., Gobello C.

Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *The Veterinary Journal* 2011, **190**: 154-159.

Bollwein H., Maierl J., Mayer R., Stolla R.

Transrectal color Doppler sonography of the a. uterina in cyclic mares. *Theriogenology* 1998, **49**:1483-1488.

Bollwein H., Baumgartner U., Stolla R.

Transrectal color Doppler sonography of uterine blood flow during pregnancy in cows. *Theriogenology* 2002, **57**: 2053-2061.

Bollwein H., Mayer R., Stolla R.

Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. *Theriogenology* 2003, **60**: 597-605.

Bollwein H., Weber F., Woschée I., Stolla R.

Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. *Theriogenology* 2004, **61**: 499-509.

Bracher V., Mathias S., Allen WR.

Influence of chronic endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. *Equine Veterinary Journal* 1996, **28**: 180-188.

Bucca S.

Ultrasonographic monitoring of the fetus. In: McKinnon AO., Squires EL., Vaala WE., Varner DD. (eds). *Equine Reproduction*, 2nd Ed., Chichester, Wiley-Blackwell; 2011: 39-54.

Bucca S., Carli A., Fogarty UMG.

How to assess equine fetal viability by transrectal ultrasound evaluation of fetal peripheral pulses. *Proceedings of the American Association of Equine Practicioners 53rd Annual Convention*, 2007, **53**: 335-338,.

Bucca S., Fogarty U., Collins A., Small V.

Assessment of fetoplacental well-being in the mare from mid-gestation to term: transrectal and transabdominal ultrasonographic features. *Theriogenology* 2005, **64**: 542–557.

Claudon M. and EFSUMB study group.

Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS)- update 2008. *Ultraschall in der Medizin* 2008, **29**: 28-44.

Cornette J. and Roos-Hesselink JW.

Normal cardiovascular adaptation to pregnancy. In: Stergiopoulos K., Brown DL. (Eds). *Evidence-based Cardiology Consult. DOI 10.1007978-1-4471-029*, Springer-Verlag London, 2014: 423-441.

Curran S., Ginther OJ.

M-mode ultrasonic assessment of equine fetal heart rate. *Theriogenology* 1995, **44**: 609-617.

Dellman HD.

Placentazione. In: Dellman HD., Eurell JA. *Istologia e Anatomia Microscopica Veterinaria*, 2ed, Milano, Casa Editrice Ambrosiana, 2000: 375-376.

Diana A., Specchi S., Baron Toaldo M., Chiocchetti R., Laghi A., Cipone M. Contrast-enhanced ultrasonography of the small bowel in healthy cats *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2011, **52**:555-559.

England G.

La gravidanza fisiologica. In: England G., *Ostetricia e fertilità del cavallo secondo Allen*, Napoli, Ed. Idelson-Gnocchi; 2004: 45-49.

Fowden AL., Forhead AJ., White KL., Taylor PM.
Equine utero-placental metabolism at mid and late gestation. *Experimental Physiology* 2000, **85**: 539-545.

Gaschen L.
Ultrasonography of small intestinal inflammatory and neoplastic diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinics Small Animal* 2011, **41**:329-34,.

Giles RC., Donahue JM., Hong CB., Tuttle PA., Petrites-Murphy MB., Poonacha KB., Roberts AW., Tramontin RR., Smith B., Swerczek TW.
Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3527 cases (1986- 1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1993, **203**: 1170-1175.

Ginther OJ.
Physical interactions between the uterus and conceptus. *Proceedings of the American Association of Equine Practicioners 44rd Annual Convention*, 1998, **44**:73-90.

Ginther OJ., Griffin PG.
Equine fetal kinetics: presentation and location. *Theriogenology* 1993, **40**: 1–11.

Haers H., Vignoli M., Paes G.
Contrast harmonic ultrasonographic appearance of focal space-occupying renal lesions. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2010, **51**: 516-562.

Haers H., Daminet S., Smets PM., Duchateau L., Aresu L., Saunders J. H.
Use of quantitative contrast-enhanced ultrasonography to detect diffuse renal changes in Beagles with iatrogenic hypercortisolism. *American Journal of Veterinary Research* 2013, **74**: 70-77.

Hua X., Zhu LP., Li R., Zhong H., Xue YF., Chen ZH.
Effects of diagnostic contrast-enhanced ultrasound on permeability of placental barrier: a primary study. *Placenta* 2009, **30**: 780–784.

Jimenez DA., O'Brien RT., Wallace JD., Klocke E.
Intraoperative contrast-enhanced ultrasonography of normal canine jejunum. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2011, **52**: 196-200.

Kametas NA., McAuliffe F., Hancock J., Chambers J., Nicolaidis KH.
Maternal left ventricular mass and diastolic function during pregnancy.
Ultrasound in Obstetrics and Gynecology 2001, **18**: 460-466.

Keator CS., Lindner JR., Belcik JT., Bishop CV., Slayden OD.
Contrast-enhanced ultrasound reveals real-time spatial changes in vascular perfusion during early implantation in the macaque uterus. *Fertility and Sterility* 2011, **95**: 1316-132.

Kutara K., Asano K., Kito A.
Contrast harmonic imaging of canine hepatic tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 2006, **68**: 433-438.

LeBlanc MM.
Induction of parturition. In: McKinnon AO., Voss JL. *Equine Reproduction*, Philadelphia, Lea&Febiger, 1993:574-577.

Leinonem MR., Raekallio MR., Vainio OM., Ruohoniemi MO., Biller DS., O'Brien RT.
Quantitative contrast-enhanced ultrasonographic analysis of perfusion in the kidneys, liver, pancreas, small intestine, and mesenteric lymph nodes in healthy cats. *American Journal Veterinary Research* 2010, **71**:1305-1311.

Macdonald AA., Chavatte P., Fowden AL.
Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. *Placenta* 2000, **21**: 565-574.

McGladdery AJ., Ousey JC., Rossdale PD.
Serial Doppler ultrasound studies of the umbilical artery during equine pregnancy. *Proceedings of the 3rd Conference of the International Veterinary Perinatology Society* 1993: p.37.

Marret H., Brewer M., Giraudeau B., Tranquart F., Voelker K., Satterfield W.
Ovine model to evaluate ovarian vascularization by using contrast-enhanced sonography. *Comparative Medicine* 2005, **55**: 150-5.

Marret H., Brewer M., Giraudeau B., Tranquart F., Satterfield W.
Assessment of cyclic changes of microvessels in ovine ovaries using Sonovue contrast-enhanced ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2006, **32**: 163-169.

Morresey PR.

The Placenta. In: McKinnon AO., Squires EL., Vaala WE., Varner DD. *Equine Reproduction*, 2^o Ed., Chichester, Wiley-Blackwell; 2011: 84-98.

Nakamura K., Takagi S., Sasaki N.

Contrast-enhanced ultrasonography for characterization of canine focal liver lesions. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2010, **51**: 79-85.

Ohlerth S., Ruefli E., Poirier V.

Contrast harmonic imaging of the normal canine spleen. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2007, **48**: 451-456.

Ordén MR., Gudmundsson S., Kirkinen P.

Intravascular ultrasound contrast agent: an aid in imaging intervillous blood flow? *Placenta* 1999, **20**: 235–240.

Ordén MR., Leinonen M., Kirkinen P.

Contrast-enhanced ultrasonography of uteroplacental circulation does not evoke harmful CTG changes or perinatal events. *Fetal Diagnosis and Therapy* 2000, **15**: 139-145.

Ousey JC., Kolling M., Willis D., Allen WR.

Effects of pentoxifylline on uterine blood flow, and placental and fetal development in young and aged mares with endometrosis. *Animal Reproduction Science* 2010, **121**: 343-344.

Ousey JC., Kolling M., Newton R., Wright M., Allen WR.

Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography. *Equine Veterinary Journal* 2012, **44** (Suppl.41): 15-21.

Phillips P., Gardener E.

Contrast-agent detection and qualification. *European Radiology* 2004, Suppl.,**14**: 4-10.

Pipers FS., Adams Brendemuehl CS.

Techniques and application of transabdominal ultrasonography in the pregnant mare. *Journal of the American Veterinary Association* 1984, **185**: 766-771.

Piscaglia F. and EFSUMB study group.

The EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Practice of Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS): Update 2011 on non-hepatic applications. *Ultraschall in der Medizin* 2011, DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1281676>.

Poret-Bazin H., Simon EG., Bleuzen A., Dujardin P., Patat F., Perrotin F.
Decrease of uteroplacental blood flow after feticide during second-trimester pregnancy termination with complete placenta previa: Quantitative analysis using contrast-enhanced ultrasound imaging. *Placenta* 2013, **14**: 113-115.

Quaia E.

Principi fisici e tecniche contrasto specifiche. In: Quaia E. *Mezzi di contrasto in ecografia, applicazioni addominali*, Ed. Spriger-Verlag, 2007: 1-6.

Ragavendraa N., Tarantal AF.

Intervillous Blood Flow in the Third Trimester Gravid Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*): Use of Sonographic Contrast Agent and Harmonic Imaging. *Placenta* 2001, **22**: 200–205.

Reef VB., Vaala WE., Worth LT, Spencer PL., Hammet B.

Ultrasonographic evaluation of the fetus and intrauterine environment in healthy mares during late gestation. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 1995, **36**: 533-541.

Reef VB., Vaala WE., Worth LT., Sertich PA., Spencer PL.

Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: development of biophysical profile. *Equine Veterinary Journal* 1996, **28**: 200–208.

Renaudin CD., Liu IK. M., Troedsson MHT., Schrenzel MD.

Transrectal ultrasonographic diagnosis of ascending placentitis in the mare: a report of two cases. *Equine veterinary Education* 1999, **11**: 69-74.

Renaudin CD., Troedsson MHT., Gillis CL., King VL., Bodena A.
Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by transrectal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. *Theriogenology* 1997, **47**: 559-573.

Rossdale PD.

The fetal foal: placenta. *Equine Veterinary Journal Suppl.* 2005, **35**: 22-25.

Rossi F.

Contrast enhanced ultrasound: basic and clinical applications in veterinary medicine. *Veterinaria* 2007, **21**: 49-60.

Russo M., Vignoli M., England GC.

B-mode and contrast-enhanced ultrasonographic findings in canine prostatic disorders. *Reproduction in Domestic Animal* 2012, **47** (Suppl 6): 238-42.

Salwei RM., O'Brien RT., Matheson JS.

Use of contrast harmonic ultrasound for the diagnosis of congenital portosystemic shunts in three dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2003, **44**: 301-305.

Samuel C A., Allen WR., Steven DH.

Studies on the equine placenta. I. Development of the microcotyledons. *Journal of Reproduction and Fertility* 1974, **41**:441-445.

Samuel CA., Allen WR., Steven DH.

Ultrastructural development of the equine placenta. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975, **23**: 575-578.

Santschi E., Vaala WE.

Identification of the High-Risk Pregnancy. In: McKinnon AO., Squires EL., Vaala WE., Varner DD. *Equine Reproduction*, 2° Ed., Chichester, Wiley-Blackwell; 2011: 5-15.

Sboros V., Averkiou M., Lampaskis M., Thomas DH., Silva N., Strouthos C., Docherty J., McNeilly AS.

Imaging of the ovine corpus luteum microcirculation with contrast ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2011, **37**: 59-68.

Schmiedl UP., Komarniski K., Winter TC., Luna JA., Cyr DR., Ruppenthal G., Schlieff R.

Assessment of Fetal and Placental Blood Flow in Primates Using Contrast Enhanced Ultrasonography. *Journal of Ultrasound in Medicine* 1998, **17**: 75-80.

Silver M., Steven DH.

Placental exchange of blood gases. In: Steven DH. *Comparative Placentation*, London, Ed, DH. Steven Academic Press, 1975: 161-188.

Steven DH. and Samuel CA.

Anatomy of placental barrier in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975, **23** Suppl: 579-582.

Troedsson M., Sage AM.

Fetal/Placental Evaluation in the Mare. Recent Advances in Equine Reproduction 2001, *International Veterinary Information Service* (www.ivis.org).

Vaala WE.

Monitoring the High-Risk Pregnancy. In: McKinnon AO., Squires EL., Vaala WE., Varner DD. *Equine Reproduction*, 2^o Ed., Chichester, Wiley-Blackwell; 2011: 16-24.

Vasapollo B., Novelli GP., Valensise H.

Total vascular resistance and left ventricular morphology as screening tools for complications in pregnancy. *Hypertension* 2008, **51**: 1020-1026.

Waller KR., O'Brien RT., Zagzebski JA.

Quantitative contrast ultrasound analysis of renal perfusion in normal dog. *Veterinary Radiology Ultrasound* 2007, **48**: 373-377.

Wilscher S. and Allen WR.

The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Veterinary Journal* 2003, **35**: 476-483.

Zhou YJ, Yuan ML, Li R, Li-Ping Zhu, Chen ZU.

Real-Time Placental Perfusion on Contrast-Enhanced Ultrasound and Parametric Imaging Analysis in Rats at Different Gestation Time and Different Portions of Placenta. *PLoS ONE* 8(4):e58986, doi:101371/journal.pone.0058986, 2013, 8 (4).

YanT., Cui K., Huang X., Ding S., Zheng Y., Luo Q., Liu X., Zou L.

Assessment of therapeutic efficacy of miR-126 with contrast-enhanced ultrasound in preeclampsia rats. *Placenta* 2014, **35**(1): 23-29.

PROGETTO 2

VALUTAZIONE ECOCARDIOGRAFICA LONGITUDINALE IN CORSO DI GRAVIDANZA NORMALE NELLA CAVALLA

CAPITOLO 1- REVISIONE DELLA LETTERATURA

1.1 VALUTAZIONE ECOCARDIOGRAFICA IN CORSO DI GRAVIDANZA

L'adattamento cardiovascolare materno durante la gravidanza garantisce l'adeguato apporto nutritivo e lo sviluppo del feto. Un deficit nel raggiungimento di tale adattamento può essere associato a complicazioni materne e fetali, quali, nella donna, disturbi ipertensivi e restrizione della crescita fetale (Cornette J. e Roos-Hesselink JW., 2014). Ci sono evidenze che gravidanze complicate da riduzione della crescita intrauterina siano associate a deficit nell'espansione dello spazio intravascolare materno e nel fisiologico aumento dell'*output* cardiaco (Kametas NA. et al., 2001) e che una compromessa perfusione uterina sia associata ad ipertensione gestazionale.

Inoltre, nella donna con preesistenti problemi cardiaci il lavoro ed il carico volumetrico indotto dallo stato gravidico possono provocare il deterioramento della funzione cardiaca (Cornette J. and Roos-Hesselink JW., 2014).

Lo studio dell'adattamento cardiovascolare materno in gravidanza fornisce informazioni sull'interazione tra l'omeostasi materna e fetale e può rivelarsi un utile strumento di screening verso le complicanze in corso di gestazione (Blanco PG. et al., 2011).

I cambiamenti emodinamici che intervengono in corso di gravidanza sono stati descritti ampiamente nella donna ed in letteratura sono riportati alcuni studi anche nel cane e nel topo (Desai KD. et al., 2004; Eghbali M. et al. 2005; Valensise H. et al. 2000; Blanco PG. et al., 2008; Blanco PG. et al. 2011; Blanco PG. et al., 2012). Grazie alla sua ampia diffusione, alla non

invasività ed alla possibilità di eseguire esami ripetuti, l'ecocardiografia è il metodo preferenziale di valutazione cardiaca in corso di gravidanza normale e patologica nella donna. L'ecocardiografia M-mode, 2D e Doppler è stata ampiamente usata in medicina umana per valutare la funzionalità cardiaca ed in particolare la funzione sistolica ed i cambiamenti morfologici del ventricolo sinistro nel corso della gestazione.

Le modificazioni emodinamiche che avvengono durante la gravidanza normale nella donna sono dovute ad una caduta delle resistenze periferiche ed un aumento dell'*output* cardiaco e del volume plasmatico. La maggior parte di queste modificazioni si rendono evidenti nel primo trimestre di gravidanza (Valensise H. et al., 2000).

Il sovraccarico volumetrico induce ipertrofia cardiaca, con corrispondente aumento della massa del ventricolo sinistro (VS massa) ed incremento dell'*output* cardiaco o portata (CO) (Kametas NA. et al., 2001; Desai D. et al., 2004). L'aumento del CO è stato imputato a molteplici fattori, quali aumento del precarico, diminuzione del postcarico, aumento della compliance vascolare, rimodellamento ventricolare e modificazioni nel sistema renina-angiotensina-aldosterone. L'aumento del CO è inoltre influenzato da un incremento della performance miocardica. Studi ecocardiografici e Doppler hanno mostrato che il CO durante la gravidanza fisiologica continua ad aumentare fino a metà della gestazione; l'incremento iniziale sarebbe imputabile all'aumento della frequenza cardiaca (FC) seguito da un incremento nello *stroke volume* o volume di eiezione (SV) (Valensise H. et al., 2000). Tuttavia i precisi cambiamenti del CO in corso di gravidanza rimangono controversi ed il contributo relativo alla portata dell'aumento della FC e dello SV non è stato ben chiarito (Desai DK. et al., 2004).

L'accorciamento del ventricolo sinistro (VS) dipende da contrattilità, precarico, postcarico e frequenza cardiaca. Modificazioni negli indici di funzione del VS relativi alla fase di eiezione, quali la velocità di accorciamento circonferenziale delle fibre (Vcf), la frazione di accorciamento (FA) e la frazione di eiezione (FE) sono state variamente riportate aumentare, rimanere costanti o diminuire in corso di gravidanza. Tali parametri sono misure dell'accorciamento del VS quindi sono influenzate dai suddetti fattori (Estensen ME. et al., 2013).

Sempre nella donna, studi pubblicati sulla funzione diastolica riportano differenti risultati. In un lavoro, utilizzando il *Tissue Doppler Imaging* (cioè le velocità miocardiche misurate tramite metodica Doppler) è stata riscontrata una riduzione della velocità miocardica Em con Am inalterata ed una variazione analoga nelle velocità di flusso E ed A (Bamfo JE. et al., 2007), mentre Kametas et al., utilizzando il Doppler convenzionale hanno trovato un aumento nella velocità dell'onda E del flusso mitralico nei primi due trimestri, seguita da un suo declino (Kametas Na. et al., 2001) ed un terzo studio ha mostrato un calo nella funzione sia sistolica che diastolica nelle fasi tardive di gestazione (Estensen ME. et al., 2013).

Durante la gravidanza nel topo, l'ipertrofia cardiaca è associata ad una diminuzione della frazione d'accorciamento, indicando quindi un calo nella funzione sistolica (Eghbali M. et al. 2005).

Durante la gravidanza normale della cagna, le modificazioni emodinamiche sembrano comportare una diminuzione del postcarico, un incremento nella funzione sistolica e lo sviluppo di ipertrofia cardiaca (Blanco PG et al., 2012). L'adattamento morfologico è caratterizzato dall'aumento del volume ventricolare telediastolico (VS VDF- volume

diastolico finale del VS) e dello spessore della parete libera VS e dalla riduzione del diametro VS telesistolico (VSDs) durante la seconda metà della gestazione. Inoltre, la FA e la Vcf aumentano dal 30° giorno di gravidanza (Blanco PG. et al., 2011). La riduzione della resistenza vascolare periferica è uno dei principali fattori determinanti l'aumento dello SV e del CO osservati in questa specie (Blanco PG. Et al., 2011).

Nella specie equina, ci sono informazioni limitate sulla funzione cardiovascolare in corso di gravidanza normale.

A nostra conoscenza, mancano studi relativi al monitoraggio ecocardiografico in corso di gravidanza nella fattrice ed informazioni relative ad eventuali modificazioni dei parametri ecocardiografici morfo-funzionali del ventricolo sinistro in risposta all'adattamento allo stato di gravidanza.

Ad oggi le tecniche di uso comune in ecocardiografia equina includono le modalità bidimensionale, monodimensionale (M-mode) e Doppler, in modalità pulsata e a codice di colore per l'esame dei flussi ematici intracardiaci.

Il *Tissue Doppler Imaging* (TDI) è una nuova tecnica, recentemente applicata anche in ecocardiografia equina, che consente di ottenere indici addizionali per valutare quantitativamente la funzionalità globale e regionale del ventricolo sinistro.

Pur con una serie di limitazioni, dovute principalmente alle difficoltà di trasferire sul cavallo le metodiche applicate e standardizzate per la donna ed i piccoli animali, l'uso dell'ecocardiografia potrebbe costituire anche in questa specie un valido ausilio per esprimere un giudizio sulla fisiopatologia cardiaca in corso di gravidanza.

Sebbene i disturbi cardiaci siano rari nel cavallo, le patologie cardiache occulte potrebbero rivelarsi in corso di gravidanza, a causa dell'aumentato carico di lavoro.

Una migliore conoscenza della risposta del cuore ed in particolare del ventricolo sinistro alla gravidanza potrebbe servire come base per il monitoraggio della fattrice gravida. I parametri morfo-funzionali cardiaci nelle fattrici gravide destinate a sviluppare complicanze potrebbero essere differenti da quelle con decorso ed esito normale.

Pertanto, la valutazione della funzionalità cardiaca ed in particolare del ventricolo sinistro, con l'eventuale evidenza di un'alterata geometria o funzione potrebbe fornire importanti informazioni prognostiche anche in questa specie.

1.2 L'ESAME ECOCARDIOGRAFICO NEL CAVALLO

Al fine dell'indagine ecocardiografica, nel cavallo vengono comunemente utilizzate nella pratica veterinaria le tecniche bidimensionale (2D) e monodimensionale (M-mode) affiancate dall'ecografia Doppler a codice di colore, ad onda pulsata e continua per lo studio dei flussi ematici (Hoffmann KL., 1998). Tecniche ecocardiografiche avanzate, quali il Tissue Doppler Imaging, l'M-mode anatomico ed il 2D Speckle Tracking, recentemente introdotte anche in ecocardiografia equina, sono ad oggi limitate ad un uso in ambito di ricerca.

1.2.1 Tecnica d'esame e preparazione del paziente

Il paziente dovrebbe essere contenuto in travaglio, in ogni caso mantenuto in stazione quadrupedale e posto nelle migliori condizioni possibili, affinché sia tranquillo e muscolarmente rilassato. La tachicardia è facilmente indotta da eccitazione e non aiuta l'esecuzione e l'interpretazione dell'esame. Il contenimento farmacologico dovrebbe essere evitato se possibile; l'acepromazina, nei casi in cui sia inevitabile la sedazione, sembra essere la sostanza migliore dal punto di vista dell'effetto sulle indagini ecocardiografiche di tipo quantitativo (Patteson MW, 1996).

E' più facile ottenere immagini di qualità soddisfacente se si opera un'adeguata tricotomia in corrispondenza delle finestre acustiche: il pelo dev'essere tosato su entrambi i lati del torace, generalmente dal secondo al quarto spazio intercostale e da appena sotto il livello del gomito a circa dieci centimetri sopra di esso (Hoffmann KL., 1998). Oltre alla corretta impostazione (settaggio) dello strumento, è opportuno utilizzare sonde operanti a frequenze generalmente comprese tra 2.0 e 3.5 MHz per soggetti adulti di varia conformazione, che garantiscono la considerevole profondità

di indagine necessaria in questa specie, generalmente compresa tra 20-30 cm. Le sonde più indicate sono costituite da trasduttori settoriali elettronici o *phased array* (Porciello F., 2004). Simultaneamente all'esame, è indispensabile registrare un tracciato elettrocardiografico sincronizzato alle immagini ecocardiografiche ed eco Doppler, al fine di determinare il *timing* preciso degli eventi cardiaci.

1.2.2 Finestre acustiche, immagini e scansioni cardiache

Nel cavallo, a differenza dell'uomo e dei piccoli animali, le finestre acustiche e le relative proiezioni ecotomografiche cardiache sono numericamente ridotte. La principale limitazione è rappresentata dal fatto che l'apice del cuore giace sullo sterno e questo preclude la possibilità di ottenere un'immagine in proiezione asse lungo apicale da sinistra; ciò comporta, ad esempio, l'impossibilità di ottenere un ottimale allineamento Doppler al flusso ematico, sia aortico che atrio-ventricolare sinistro.

La sede anatomica delle finestre acustiche cardiache nel cavallo viene individuata come segue:

- emitorace destro: sul IV o V spazio intercostale, subito dorsalmente alla tuberosità olecranica;
- emitorace sinistro: tra il III e IV spazio intercostale, caudalmente alla tuberosità olecranica e dorsalmente all'itto.

Se si dispone di sonde con adeguata capacità di penetrazione, spesso la finestra acustica destra è sufficiente al fine di una buona visualizzazione diagnostica delle strutture cardiache. Generalmente, si fa ricorso alla finestra acustica di sinistra quando il cuore di sinistra non viene esaurientemente visualizzato da destra ed inoltre per eseguire l'applicazione Doppler spettrale, che richiede il miglior allineamento possibile con la direzione dei flussi ematici (Porciello F., 2004).

Di seguito sono descritte le immagini ed i piani di scansione utilizzati durante l'esame ecocardiografico nel cavallo. Le rispettive figure sono riportate nella **Tavola I**.

1.2.2.1 Immagini dell'emitorace di destra

Piani in asse lungo parasternale destro

Tratto di afflusso ventricolare sinistro: immagine a 4 camere. Il trasduttore è posizionato a livello del IV o V spazio intercostale (s.i.) dorsalmente all'olecrano ed il centro dell'immagine settoriale è ottimizzato per la visualizzazione del tratto di afflusso ventricolare e del setto interventricolare (SIV). Long et al. utilizzano questa immagine come quella di riferimento da cui possono essere ottenute le altre visioni. La sonda può poi essere diretta dorsalmente o ventralmente per visualizzare le 4 camere (Long KJ. et al., 1992). (**Fig. 1.2.1, Tav. I**)

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: atrio sinistro, ventricolo sinistro (VS), valvola mitrale (VM) e sue corde tendinee, parete posteriore VS, atrio destro (AD), ventricolo destro (VD), setto e valvola tricuspide (VT) (Hoffmann KL., 1998).

Tratto di efflusso ventricolare sinistro: immagine a 5 camere. Dall'immagine 4 camere di riferimento il piano viene ruotato in senso orario per ottenere la visione in asse lungo della aorta (**Fig. 1.2.2, Tav. I**).

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: aorta e valvola aortica (AV), atrio sinistro (AS), VS, VM e sue corde tendinee, tratto di efflusso VS, AD, VD e setto (Hoffmann KL., 1998).

Piani in asse corto parasternale destro

Per i piani in asse corto parasternale destro, il trasduttore viene applicato nella posizione per ottenere l'immagine di riferimento (tratto di

afflusso ventricolare sinistro, 4 camere) o poco più ventralmente (Hoffmann KL., 1998). I piani in asse corto parasternale destro sono tradizionalmente visualizzati al fine di eseguire l'esame e le misurazioni M-mode.

Ventricolo sinistro a livello dei muscoli papillari. Il piano di propagazione del fascio sonografico viene ruotato di 80°-90° in senso antiorario in modo da ottenere un vero asse corto a livello dei muscoli papillari (**Fig. 1.2.3, Tav. I**).

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: VS e muscoli papillari, parete posteriore VS, VD e setto (Hoffmann KL., 1998).

Ventricolo sinistro a livello delle corde tendinee. Il centro del fascio settoriale viene direzionato di poco caudalmente o dorsalmente per ottenere l'immagine a livello delle corde tendinee. Per lo studio in modalità M-mode, la linea cursore può essere posta nella camera tra i muscoli papillari e le corde tendinee. Le dimensioni del ventricolo dovrebbero essere misurate subito sotto il livello della valvola mitrale.

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: VS con aspetto "a champignon", corde tendinee della VM, parete posteriore VS, VD e setto (Hoffmann KL., 1998).

Ventricolo sinistro a livello della valvola mitrale. L'immagine si ottiene ruotando il trasduttore di 60°-80° in senso antiorario, mentre si dirige il centro del settore dorsalmente ed anche di poco caudalmente o cranialmente (Long KJ. a tri et al., 1992). Il cursore M-mode è posto attraverso la valvola mitrale.

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: VS, VM con aspetto "a bocca di pesce", tratto di efflusso VS, VD e parete settale (Hoffmann KL., 1998) (**Fig. 1.2.4, Tav. I**).

Base del cuore a livello della radice aortica. La valvola aortica si mostra in asse corto quando il trasduttore dalla posizione di riferimento

viene ruotato di circa 30° in senso antiorario (Long KJ. et al., 1992). Per le indagini e misurazioni in M-mode, il cursore è posizionato attraverso la valvola aortica.

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: aorta (AO) e AV con aspetto a triangolo, c.d. a simbolo "Mercedes-Benz", AS, arteria polmonare (AP) e valvola polmonare (VP), AD, tratto di efflusso VD e VT (Hoffmann KL., 1998). (**Fig. 1.2.5, Tav. I**).

Piani obliqui in asse corto parasternale craniale destro.

Tratto di efflusso ventricolare destro. Per visualizzare l'immagine dell'arteria polmonare e del tratto di efflusso ventricolare destro, il fascio ultrasonoro può essere diretto più cranialmente rispetto alla visione dell'aorta (Long KJ. et al., 1992) (**Fig. 1.2.6, Tav. I**).

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: AO, arteria coronaria destra (ACD), AP e VP, AD, tratto di efflusso VD, cresta sopraventricolare e VT (Hoffmann KL., 1998).

1.2.2.2 Immagini dell'emitorace di sinistra

Piani in asse lungo parasternale caudale sinistro

Tratto di afflusso ventricolare sinistro: immagine a 2 o 4 camere. Long et al., identificano in questa l'immagine di riferimento per l'emitorace di sinistra, da cui partire per ottenere le altre scansioni (Long KJ. et al., 1992). L'immagine ottenuta rappresenta una visione a 4 camere se la profondità del fascio consente di includere tutte e quattro le camere cardiache, ed a 2 camere se solo il ventricolo ed atrio sinistri e la valvola mitrale sono visualizzati (Reef VB., 1990) (**Fig. 1.2.7, Tav. I**).

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: AS, VS, VM, AD, VD, parete settale e VT (Hoffmann KL., 1998).

Visione apicale a 4 o 5 camere. Tale scansione rappresenta l'asse lungo del cuore più verticalmente possibile. Questa scansione visualizza in maniera ottimale il tratto di afflusso ventricolare sinistro (4 camere). Per includere il tratto di efflusso ventricolare sinistro e l'aorta (5 camere), la sonda è angolata maggiormente in senso craniale rispetto alla scansione 4 camere di riferimento (Long KJ. et al.,1992).

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: AO, AS, VS e tratto di efflusso VS, VM, AD, VD, setto e VT (Hoffmann KL., 1998).

Piani in asse lungo parasternale craniale sinistro:

Tratto di efflusso ventricolare sinistro. Il trasduttore viene orientato in modo da visualizzare l'aorta ascendente in asse lungo (**Fig. 1.2.8, Tav. I**). E' utilizzata per la rilevazione Doppler del flusso trans-aortico.

Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: AO e VA, tratto di efflusso VS, AD, VD, parete settale e VT (Hoffmann KL., 1998).

Piani obliqui parasternali craniali sinistri

Immagine della arteria polmonare e della valvola polmonare. Le strutture cardiache visualizzate in questo piano includono: AO, AP , VP, tratto di efflusso VD e ACD (Long KJ. et al., 1992) (**Fig. 1.2.9, Tav. I**).

1.2.3 Valutazione 2D, M-mode, Doppler e TDI delle dimensioni cardiache e degli indici di funzionalità cardiaca

Ai fini dello studio funzionale, si rende indispensabile misurare una serie di indici. Nell'ambito di questi indici, i più importanti e generalmente usati sono quelli riguardanti la funzione del ventricolo sinistro (VS). Quest'ultima può essere distinta in funzione sistolica, che rappresenta la

capacità contrattile ed eiettiva della camera ventricolare e funzione diastolica, relativa alla possibilità di accoglimento del sangue da parte della stessa camera.

Con l'ecocardiografia 2D ed M-mode possono essere calcolate la funzionalità sistolica VS, l'entità della dilatazione delle camere ventricolari destra e sinistra, l'entità dell'ispessimento sistolico delle strutture muscolari ed il loro ispessimento assoluto e possono essere quantificati la massa del ventricolo sinistro e l'ingrandimento dell'atrio sinistro. Per quanto riguarda gli indici di funzionalità diastolica, è generalmente necessaria l'applicazione Doppler allo studio dei flussi ematici (Porciello F., 1994).

Il *Tissue Doppler Imaging* (TDI), uno dei più recenti sviluppi in ecocardiografia equina, è in grado di fornire dati quantitativi sulla funzione miocardica. Sfruttando gli stessi principi fisici del Doppler di flusso, il TDI riconosce e misura i segnali a bassa frequenza e ad elevata ampiezza generati dal movimento del tessuto miocardico e consente di determinare direttamente le velocità miocardiche, valutando la funzione cardiaca a livello regionale piuttosto che globale (Sepulveda MF. et al., 2005).

Ad oggi, sono disponibili ancora poche indicazioni sull'utilizzo del TDI in cardiologia equina. Anche in questa specie, la tecnica potrebbe servire per valutare in maniera quantitativa la funzione del ventricolo sinistro (VS) sistolica e diastolica, anche se tuttora l'utilizzo è limitato ad un ambito di ricerca (Schwarzwald CC. et al., 2009).

1.2.3.1 Misurazioni ed indici del ventricolo sinistro in M-mode

Gli indici di funzionalità sono calcolati unitamente alle misurazioni monodimensionali in M-mode delle dimensioni VS e vedono la frazione di accorciamento (FA), pressochè come l'unico indice di funzione sistolica VS routinariamente usato nel cavallo (Boon JA., 1998; Patteson MW. et al.,

1995). Tuttavia, la FA rappresenta l'accorciamento del ventricolo in una sola dimensione, non considerando il fatto che in realtà la camera si contrae variando in tutte le tre dimensioni.

I primi dati di interesse clinico sono rappresentati dalle misure lineari ottenibili dalla proiezione monodimensionale transventricolare, generalmente in asse corto parasternale destro: diametro interno ventricolo destro in sistole (DVDs) ed in diastole (DVDd), spessore del setto interventricolare in fase sistolica (SIVs) ed in fase diastolica (SIVd), diametro interno del ventricolo sinistro (VS) in fase sistolica (DVSs) e diastolica (DVSd) e spessore della parete libera del ventricolo sinistro in sistole (PPVSS) ed in diastole (PPVSD) (Grenacher PA. e Schwarzwald CC., 2010). Le misurazioni vengono effettuate alla fine della diastole (telediastole), in corrispondenza dell'inizio del complesso QRS ed alla fine della sistole (telesistole), in corrispondenza del punto di massimo ispessimento del setto interventricolare.

I valori sono soggetti ad ampia variabilità, legata a fattori quali età dell'animale, razza, peso corporeo, frequenza cardiaca durante l'esame e condizioni di allenamento (Bakos Z. et al., 2002). Valori di riferimento relativi alle misurazioni ottenute in diverse razze equine sono disponibili in bibliografia.

La FA del VS è un indice calcolato per stimare la funzione sistolica globale del medesimo (Boon JA., 1998; Otto CM., 2004), applicando la seguente formula:

$$FA \% = [(DVSd - DVSs) / DVSd] \times 100$$

Nel cavallo, la FA è normalmente compresa tra 32% e 55%.

Bisogna ricordare che la funzione sistolica espressa dalla FA non è una misura diretta della funzionalità miocardica ventricolare, essendo questa influenzata dal precarico, dal postcarico e dalla contrattilità; ne consegue

che la capacità contrattile non è quantificabile ricorrendo all'esclusiva valutazione della modificazione di FA (Porciello F., 2004).

Dalle misurazioni lineari del diametro del VS (DVS) è possibile derivare il volume diastolico finale (VDF) e sistolico finale (VSF) e calcolare, per differenza, il volume di eiezione o *stroke volume* (SV), applicando la formula di Teicholz (Boon JE., 1998):

$$VSVol = 7 DVS^3 / (2,4 + DVS)$$

dove VS Vol è il volume VS (in sistole o diastole), 2,4 rappresenta il fattore di correzione e DVS è espresso in centimetri.

La frazione di eiezione (FE) è un indice di funzionalità VS che esprime la differenza percentuale tra il volume diastolico e quello sistolico, secondo la formula:

$$FE \% = [(VSVol.d - VSVol.s) / VSVol.d] \times 100$$

Relativamente a questi parametri, bisogna considerare che, nell'applicazione della formula di Teicholz, si assume arbitrariamente la cavità ventricolare sinistra come una figura solida regolare, avente forma ovoidale con l'asse maggiore doppio dell'asse minore. Ne consegue che i valori ottenuti possono non corrispondere alla realtà anatomica, in quanto una figura complessa quale il lume ventricolare, viene così determinata in funzione di una singola misura lineare (Porciello F., 2004).

Una stima della massa del VS (VS massa) si può ottenere usando la formula di Devereux e Reichek:

$$VS \text{ massa (g)} = 1,04 \times [(DVSd + PPVS + SIV)^3 - DVSd^3] - 13,6$$

Questo metodo è molto usato in medicina umana ed è stato validato in uno studio ecocardiografico con comparazione a campioni post-mortem nel cavallo (Young LE. et al., 2005).

1.2.3.2 Misurazioni ed indici del ventricolo sinistro in 2D

La lunghezza ed il diametro del VS possono essere ottenuti anche da immagini 2D rispettivamente in asse lungo e corto.

- Indici basati su misurazioni planimetriche dell'area del lume e delle pareti VS consentono di determinare l'accorciamento nelle due dimensioni ma sono meno ripetibili rispetto alle tecniche M-mode e sono poco impiegate nella valutazione cardiaca nel cavallo (Schefer KD. et al., 2010).

- Le stime volumetriche della dimensione e funzione VS sono considerate più accurate e meno influenzate dall'alterata geometria delle camere rispetto agli indici lineari (Lang RM. et al., 2005). Valutazioni funzionali basate su tali stime di tipo volumetrico, quali il calcolo della FE, indice standard di funzione VS sistolica nell'uomo e di altri indici (SV), nel cavallo non sono routinariamente utilizzate, principalmente in ragione di varie difficoltà di tipo tecnico-analitico; infatti richiedono, oltre al notevole dispendio di tempo, piani di immagine molto precisi del ventricolo nell'arco di diversi cicli cardiaci, difficili da ottenere nei grossi animali; inoltre, sono basate su varie assunzioni di tipo geometrico ed approssimazioni che ne limitano l'accuratezza (Voros K. et al., 1990).

Nonostante questi limiti metodologici, studi recenti hanno dimostrato che stime di tipo volumetrico, ottenute da immagini 2D in asse lungo utilizzando il metodo di Simpson modificato, risultano superiori agli indici lineari e di area in asse corto nell'identificare variazioni della funzione LV indotte da esercizio (Schefer KD. et al., 2010). Inoltre, l'affidabilità di questo metodo è stata dimostrata confrontandolo con la tecnica standard invasiva per il calcolo dell'*output* cardiaco (McConachie E. et al., 2013).

Il metodo Simpson's (o dei "dischetti multipli") modificato 4-camere *single-plane* prevede la misurazione della lunghezza del VS (VSL) e la tracciatura dell'area del VS seguendo la superficie endocardica (VSA) in

sistole ed in diastole, da cui viene automaticamente calcolato il volume della camera nelle due fasi (VVSd e VVSs) tramite l'applicazione di una complessa formula matematica (Lang RM. et al., 2005). Dal volume del VS in sistole ed in diastole vengono calcolati lo SV e la FE (Boon JE., 1998):

$$SV \text{ (ml)} = VVSd - VVSs; FE \% = (VVSd - VVSs) / VVSd \times 100.$$

1.2.3.3 Misurazioni ed indici del ventricolo sinistro con Doppler

Le misurazioni flussimetriche in Doppler pulsato (PW- Doppler) registrate a livello del tratto di efflusso VS che possono essere usate per valutare la funzione sistolica del VS includono gli intervalli di tempo sistolici (ITS), la velocità di picco del flusso aortico, il tempo di accelerazione e decelerazione e l'area sottesa alla curva o integrale velocità-tempo (IVT) del profilo dell'onda (Marr CM. e Patteson M., 2010). L'IVT (cm) è calcolato automaticamente dalla maggior parte dei comuni pacchetti software una volta tracciato il profilo della traccia Doppler pulsato dell'onda aortica in sistole. Tale parametro, moltiplicato per l'area di sezione (CSA, cross-sectional area) del vaso attraverso cui si vuole calcolare il flusso (Ao), consente di calcolare il volume di eiezione (SV) attraverso il tratto di efflusso ventricolare sinistro:

$$SV \text{ (ml)} = Ao \text{ IVT} \times Ao \text{ CSA}$$

Poichè la stima volumetrica assume che il flusso passi attraverso un orificio circolare, l'area di sezione dell'aorta (Ao CSA) viene calcolata sulla base della formula:

$$Ao \text{ CSA (cm}^2\text{)} = \pi \times (0,5 \times D^2),$$

ove D = diametro aortico (cm) (Boon JE., 1998).

Il punto di misurazione del diametro vasale rimane la maggior fonte di errore del metodo nel calcolo dello SV. Blissit et al. hanno ottenuto risultati migliori in termini di affidabilità misurando l'aorta ascendente con il

metodo *leading-edge* dalla scansione parasternale destra asse lungo (Blissit KJ. et al., 1997) e Giguere et al. hanno ulteriormente confermato che la misurazione della CSA dalla scansione parasternale destra in asse lungo è superiore all'uso della scansione in asse corto (Giguere S. et al., 2005).

Sebbene l'utilizzo degli ITS sia stato descritto nel cavallo, il loro valore clinico non è dimostrato e tali indici non vengono comunemente misurati nella pratica (Bonagura JD. e Blissit KJ., 1995).

La valutazione della funzione diastolica del VS prevede sostanzialmente la valutazione delle velocità di flusso transmitralico: né queste né altri indici di funzione VS diastolica derivati da ecografia Doppler sono unanimamente considerati nel cavallo (Schwarzwalder CC., et al., 2007).

1.2.3.4 Valutazione dell'*output* cardiaco

L'*output* cardiaco (CO) o portata cardiaca è la miglior variabile disponibile per la valutazione della funzione cardiovascolare complessiva. Ad oggi il monitoraggio del CO nel cavallo adulto è limitato ad applicazioni nell'ambito della ricerca (McConachie E. et al., 2013).

Il CO può essere stimato sulla base dello SV calcolato con le differenti modalità ecocardiografiche ed eco-Doppler tramite la formula:

$$\text{CO (ml/min)} = \text{SV (ml)} \times \text{FC (bpm)},$$

dove FC (bpm) è la frequenza cardiaca in battiti per minuto.

Sebbene il calcolo del CO con tecnica Doppler sia stato dimostrato avere un buon grado di *agreement* col metodo della termodiluizione e quindi di essere una stima affidabile nel cavallo adulto (Blissit KJ. et al., 1997), alcuni limiti metodologici possono rendere difficile l'uso di questo metodo. Inoltre, indici di funzione cardiaca derivati da metodica Doppler risultano meno ripetibili di quelli derivati da ecocardiografia 2D ed M-mode e

recentemente è stato dimostrato che alcuni metodi di stima del CO, quali il 2D Simpson's modificato, sono più affidabili degli altri, tra cui l' IVT del tratto di efflusso VS e sarebbero maggiormente utili nel rilevare variazioni di entità del CO in condizioni cliniche (McConachie E. et al., 2013).

1.2.3.5 Valutazione della funzione del ventricolo sinistro con TDI

Le velocità miocardiche possono essere registrate utilizzando le diverse modalità di presentazione dell' informazione Doppler, come il color Doppler (c-TDI) ed il Doppler spettrale (PW-TDI). Il c-TDI misura le velocità miocardiche medie (e non di picco); il segnale miocardico è sovrapposto all'immagine mono o bidimensionale e, in accordo con il Doppler convenzionale, le velocità miocardiche tissutali dirette verso o lontano dal trasduttore sono codificate rispettivamente in rosso-giallo ed in blu-verde (Caso P. et al., 2005). Con il PW-TDI, un volume campione è posto nel centro della regione miocardica di interesse e consente di misurare il picco delle velocità miocardiche. Il PW TDI sembra produrre misurazioni di affidabilità maggiore rispetto al cTDI.

Poichè in tutte le tecniche Doppler l'*imaging* è angolo-dipendente, al fine di un corretto allineamento del fascio Doppler col movimento miocardico, nel cavallo si può sfruttare unicamente la proiezione parasternale in asse corto per valutare con sufficiente correttezza la funzione regionale radiale del VS (Schwarzwald CC. et al., 2009).

Complessivamente, i parametri TDI di funzione radiale sistolica indagati a livello della parete libera o posteriore del VS, ottenuti in scansione parasternale destra asse corto a livello delle corde tendinee, presenterebbero buona riproducibilità, mentre questa risulterebbe minore per alcuni relativi alla funzione diastolica VS ed anche alla funzione atriale sinistra (Schwarzwald CC. et al., 2009).

1.2.3.5.1 Valutazione della funzione radiale sistolica del VS

Le variabili TDI utilizzate nel cavallo per lo studio della funzione sistolica del VS sono riportate nella seguente tabella (**Tabella 1.2.1**).

Otto delle dieci variabili di funzione sistolica VS studiate sono intervalli di tempo sistolici (ITS), di cui il principale è l'indice di performance miocardica (IPM) o indice Tei. Gli ITS derivati da PW-TDI sembrano essere più facili da misurare e più affidabili rispetto all'ecografia convenzionale 2D e Doppler; sembrano inoltre fornire un *timing* accurato degli eventi cardiaci e mostrano una correlazione significativa con gli ITS derivati da misurazioni M-mode e Doppler pulsato (Decloedt A. et al., 2013). Tuttavia, essendo calcolati in base ad analisi relative ad un singolo segmento di parete, tali ITS potrebbero essere influenzati da anomalie locali del movimento e pertanto non essere realmente rappresentativi della funzione miocardica globale VS (Schwarzwald CC. et al., 2009).

Tabella 1.2.1 Variabili TDI utilizzate per la valutazione del movimento radiale sistolico della parete libera del ventricolo sinistro.

Scansione parasternale destra asse corto a livello delle corde tendinee

Variabili di funzione VS sistolica

Velocità del movimento di parete sistolico

S1	Velocità della contrazione isovolumetrica	Picco positivo di velocità durante la contrazione isovolumetrica
Sm	Velocità di eiezione	Picco positivo di velocità durante l'eiezione

Intervalli di tempo sistolici

tS1	Tempo fino al picco S1	Tempo dall'inizio del complesso QRS al picco S1
tSm	Tempo fino al picco Sm	Tempo dall'inizio del complesso QRS al picco Sm
PPE	Periodo di pre-eiezione	Tempo dall'inizio del complesso QRS all'inizio dell'onda Sm
IVCT	Tempo di contrazione isovolumetrica	Tempo dall'inizio dell'onda S1 all'inizio dell'onda Sm
TE	Tempo di eiezione (durata di Sm)	Tempo dall'inizio alla fine dell'onda Sm
PPE/TE	Rapporto PEP su TE	
IVCT/ET	Rapporto IVCT su TE	

Indici di funzione VS

IPM	Indice di performance miocardica	$IPM = (IVCTI + IVRT) / ET$
-----	----------------------------------	-----------------------------

In una valutazione post-esercizio il TDI è stato utile per dimostrare che, tra le variabili analizzate, S_m (velocità del movimento radiale di parete durante l'eiezione) e PPE/TE (rapporto tra periodo di pre-eiezione e tempo di eiezione) aumentavano, mentre TE (tempo di eiezione) decresceva alle frequenze più elevate, in ragione dell'accorciamento del periodo di eiezione. Il significativo incremento del valore di S_m risulta in accordo con evidenze nell'uomo, che indicano un aumento della performance sistolica durante e dopo l'esercizio fisico (Quintana M. et al., 2004). Nessun altro parametro TDI mostra variazioni consistenti o significative dopo esercizio (Schefer KD. et al., 2010).

1.2.3.5.2 Valutazione della funzione radiale diastolica del VS

Questa fase è difficile da valutare e scarsamente indagata negli esami di routine nel cavallo. Diversi parametri TDI sono stati valutati quali potenziali indicatori di funzione VS diastolica e delle pressioni di riempimento. Tali variabili TDI (Schwarzwald CC. et al, 2009) sono riportate nella seguente tabella (**Tabella 1.2.2**).

Tabella 1.2.2 Variabili TDI utilizzate per la valutazione del movimento radiale diastolico della parete libera del ventricolo sinistro.

Scansione parasternale destra asse corto a livello delle corde tendinee

Variabili di funzione VS diastolica

Velocità del movimento di parete diastolico

E1	Velocità di rilassamento isovolumetrico	Picco negativo di velocità durante rilassamento isovolumetrico
Em	Velocità della proto-diastole	Picco negativo di velocità durante il riempimento ventricolare rapido

Em/Am Rapporto Em su Am

E/Em Rapporto E su Em

dv/dt Em Curva di decelerazione di Em

DT Em Tempo di decelerazione di Em

Intervalli di tempo diastolici

IVRT Tempo di rilassamento isovolumetrico

tEm Tempo fino all'inizio di Em

Rapporto della velocità di flusso transmitralico (E) su Em

Curva di decelerazione di Em

Tempo dal picco alla fine dell'onda Em

Tempo dall'inizio dell'onda E1 all'inizio dell'onda Em

Tempo dall'inizio del complesso QRS all'inizio dell'onda Em

In generale, le variabili TDI relative alla funzione VS diastolica appaiono meno riproducibili rispetto a quelle di funzione VS sistolica; tuttavia, la maggior parte degli indici PW-TDI (ad eccezione di quelli di decelerazione del flusso diastolico precoce, $dv/dt E_m$ e $DT E_m$) presentano buona affidabilità e sembrano realmente utilizzabili per la valutazione del movimento di parete VS a riposo (Schwarzwald CC. et al., 2009).

In cavalli sottoposti ad esercizio, analogamente a quanto accade nell'uomo (Quintana M. et al., 2004), sia E_m (velocità del movimento radiale di parete in diastole precoce) che A_m (velocità del movimento radiale di parete in diastole tardiva) aumentano. Tuttavia alle frequenze cardiache più elevate, nella maggior parte dei cavalli si verifica la fusione delle onde corrispondenti ad E_m ed A_m rendendo ineseguibile la misurazione (Schefer KD. et al., 2010).

1.2.3.5.3 Valutazione della funzione atriale sinistra

La valutazione completa della funzione diastolica del VS deve comprendere oltre alle misurazioni relative a rilassamento e riempimento precoce ventricolare anche quelle tele-diastoliche, cioè relative alla funzione meccanica atriale sinistra (AS).

Le variabili utilizzate sono misure indirette della funzione AS (**Tabella 1.2.3**), in quanto basate sull'analisi del movimento della parete VS durante la fase tele-diastolica (Schwarzwald CC. et al., 2009). Complessivamente, questi parametri sono risultati più riproducibili rispetto alle variabili “dirette” di funzione AS ottenuti dall'esame ecografico della camera atriale stessa (parete libera AS) (Schwarzwald CC. et al., 2007).

Tabella 1.2.3 Variabili TDI utilizzate per la valutazione del movimento radiale diastolico della parete libera del ventricolo sinistro.

Scansione parasternale destra asse corto a livello delle corde tendinee

Variabili di funzione attiva AS

Am	Velocità della tele-diastole	Picco negativo di velocità al momento della contrazione atriale
tAm	Tempo fino al picco Am	Tempo dall'inizio dell'onda P al picco Am
pAm	Tempo fino all'inizio di Am	Tempo dall'inizio dell'onda P all'inizio dell'onda Am
dAm	Durata di Am	Tempo dall'inizio alla fine dell'onda Am
pAm/dAm	Rapporto pAm su dAm	

In generale, bisogna considerare che tutti i parametri e gli indici TDI sono probabilmente influenzati da vari fattori e principalmente da condizioni di carico, frequenza cardiaca, conduzione elettrica atriale ed atrio-ventricolare e la caratterizzazione di tale dipendenza è fondamentale ai fini di una applicazione clinica.

1.2.3.6 Valutazione dell'atrio sinistro

Nel cavallo la determinazione delle dimensioni dell'atrio sinistro (AS) è convenzionalmente limitata a misurazioni del diametro ed a valutazioni relativamente soggettive della camera. I metodi comunemente usati (M-mode in asse corto parasternale destro, a livello della base del cuore; ecografia 2D in asse lungo parasternale sinistro) non forniscono una misura accurata dell'atrio nella sua maggior ampiezza e non ne riflettono accuratamente variazioni nella geometria e nella dimensione reale.

Tuttavia, l'uso della finestra parasternale destra sembrerebbe l'approccio migliore per la visualizzazione dell'intero atrio e la misura delle massime dimensioni in ogni direzione ed in ogni istante del ciclo cardiaco (Schwarzwald CC., et al., 2007).

La funzione meccanica AS non è specificamente indagata nelle valutazioni di routine.

CAPITOLO 2 – PARTE SPERIMENTALE PROSPETTICA

In letteratura sono disponibili poche informazioni relative alle modificazioni emodinamiche di adattamento che avvengono durante il corso della gravidanza nella fattrice. La valutazione della funzionalità cardiaca materna ed in particolare del ventricolo sinistro potrebbe fornire importanti informazioni prognostiche anche in questa specie.

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare dal punto di vista ecocardiografico due fattrici sane di razza Trottatore nel corso di una gravidanza fisiologica. L'esame ecocardiografico dei soggetti è stato condotto in maniera seriale per tutta la durata della gravidanza, utilizzando tecniche convenzionali, 2D, M-mode e Doppler e tecnica *Tissue Doppler Imaging*, finalizzate alla valutazione dell'applicabilità della tecnica ed alla descrizione dei parametri morfometrici e funzionali cardiaci, in particolare relativi alla funzione del ventricolo sinistro, in corso di adattamento allo stato di gravidanza.

2.1. MATERIALI E METODI

2.1.1 Animali

Per la parte relativa agli animali inclusi nello studio si rimanda al paragrafo 2.1.1 Animali, del Progetto 1.

2.1.2 Studio ecocardiografico

Le fattrici sono state valutate ecocardiograficamente, tramite metodiche bidimensionale (2D), M-mode e Doppler e tecnica *Tissue Doppler Imaging* (TDI), in maniera seriale agli intervalli di tempo di seguito indicati (**Tabella 2.1.1**). L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito l'esame ecocardiografico è espresso come intervallo in giorni di gestazione. A partire dal VI mese (150-180 giorni) di gravidanza l'esame è stato condotto ogni 30 giorni ed ogni 10 giorni nel corso dell'ultimo mese.

Tabella 2.1.1 Intervalli di tempo di esecuzione degli studi ecocardiografici prima e durante la gravidanza nelle due fattrici

Pre-fecondazione
<i>Accertamento di gravidanza (15 e 30 giorni)</i>
40 giorni
90-100 giorni
150-180 giorni (VI mese)
181-210 giorni (VII mese)
211-240 giorni (VIII mese)
241-270 giorni (IX mese)
271-300 giorni (X mese)
310-320 giorni (XI mese)
321-330 giorni (XI mese)

Lo studio è stato sempre eseguito sui soggetti non sedati, mantenuti in stazione, in ambiente tranquillo e contenuti in travaglio.

Gli animali sono stati preventivamente tricotomizzati e la cute pulita con alcool in corrispondenza delle finestre acustiche cardiache su entrambi gli emitoraci. Per ridurre ulteriormente l'interposizione dell'aria tra cute e trasduttore, è stato utilizzato apposito gel ultrasonografico.

L'esame ecocardiografico transtoracico è stato eseguito utilizzando un ecografo (iU22, Philips Healthcare, Monza) dotato di sonda tipo *phased array*, ad uso cardiologico, operante a frequenza 5-1 MHz (S 5-1, Philips).

Simultaneamente all'esame è stato registrato un tracciato elettrocardiografico sincronizzato alle immagini ecocardiografiche ed eco Doppler. Lo strumento è stato settato in modo da ottimizzare la visualizzazione delle strutture cardiache profonde.

2.1.2.1 Acquisizione delle immagini ecocardiografiche

Lo studio ecocardiografico convenzionale in modalità 2D, monodimensionale e Doppler è stato eseguito per valutare le strutture cardiache, la dimensione delle camere, la competenza valvolare e la funzione cardiaca. L'attenzione è stata posta in particolare allo studio della funzione sistolica ventricolare sinistra; l'utilizzo della tecnica Doppler tissutale (TDI) è stato rivolto alla valutazione del movimento della parete libera del ventricolo sinistro (VS) tramite visualizzazione in modalità TDI sia a codice di colore che pulsato. E' stata inoltre valutata la dimensione dell'atrio sinistro in modalità bidimensionale.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad indagine ecocardiografica completa, eseguita da un unico operatore, secondo un protocollo di acquisizione delle immagini standardizzato, di seguito riportato.

Scansione parasternale destra:

- 1) *Cineloop* in modalità 2D di tre cicli cardiaci, in asse corto a livello dei muscoli papillari, subito sotto alla valvola mitralica. Si visualizza

l'immagine a "champignon" del ventricolo sinistro (VS), utilizzata per misurare le dimensioni della camera in sistole e diastole.

- 2) *Cineloop* in modalità 2D di tre cicli cardiaci, in asse lungo, dell'immagine a 4 camere, ottimizzata per il ventricolo sinistro, in modo da visualizzare in maniera completa, per quanto possibile, base ed apice ventricolare. Questa scansione è utilizzata per misurare e calcolare le dimensioni ed il volume VS.
- 3) *Cineloop* in modalità 2D di tre cicli cardiaci, in asse lungo, dell'immagine a 4 camere (vedi punto 2), ottimizzata per la valutazione delle dimensioni dell'atrio sinistro (AS). Il diametro massimo atriale viene calcolato da un'immagine registrata al momento della massima distensione dello stesso.
- 4) *Cineloop* in modalità 2D di tre cicli cardiaci, in asse lungo, dell'immagine a 5 camere, ottimizzata per il tratto di efflusso ventricolare sinistro, per la misurazione del diametro aortico.
- 5) Tracciato M-mode del ventricolo sinistro (VS) e della valvola mitrale in asse corto. Dalla proiezione descritta al punto 1), si esegue il tracciato monodimensionale trans-ventricolare: a tal fine, si posiziona la linea-cursore tra i due papillari, in modo che intersechi perpendicolarmente il setto interventricolare e si sovrapponga al diametro VS in asse corto. Tale valutazione è utilizzata per misurazioni ed indici M-mode del VS.
- 6) *Cineloop* in modalità TDI pulsato di tre cicli cardiaci, in asse corto a livello delle corde tendinee, ottimizzata per visualizzare la parete posteriore del ventricolo sinistro (VS). A tal fine è necessario il settaggio dello strumento per l'acquisizione delle immagini in TDI pulsato (PW-TDI): dopo l'ottimizzazione dell'immagine, aggiustando la profondità di indagine e l'ampiezza del settore, una regione d'interesse color-TDI real-time è stata sovrapposta all'immagine in scala di grigi, con un frame rate

maggiore di 100 frames/s; poi il volume campione PW-TDI (4 mm di larghezza) è stato posizionato in corrispondenza della parete libera VS, in modo da includere la regione subendocardica durante la diastole ma comprendere la parete miocardica durante l'intero ciclo cardiaco, per ottenere il tracciato velocità/tempo. Da questa immagine sono state individuate 5 onde (S1, Sm, E1, Em, Am) e registrate le rispettive velocità di picco. Per le misurazioni, la velocità di scorrimento viene aggiustata in modo da visualizzare sul display almeno tre cicli cardiaci.

- 7) Valutazione con Doppler a codice di colore e pulsato tradizionale, in asse lungo obliquo, della valvola polmonare e della valvola tricuspide. Da questa scansione, con cui si visualizzano il tratto di afflusso ed efflusso del ventricolo destro, è possibile valutare la competenza valvolare, la normalità dei flussi ed eseguire le misurazioni ad essi relative.
- 8) *Cineloop* in modalità 2D di tre cicli cardiaci, in asse corto a livello della base cardiaca, per visualizzare la valvola aortica e l'atrio sinistro (AS). In questa scansione la valvola appare con l'aspetto simile al simbolo "Mercedes benz" al centro dell'immagine; il corpo e l'orecchietta dell'atrio sinistro appaiono ad ore 8. Tale scansione è utilizzata per misurare il diametro aortico e AS.

Scansione parasternale sinistra, asse lungo:

- 1) Valutazione in modalità 2D, in asse lungo, dell'immagine delle camere cardiache di sinistra, ottimizzata, per la visualizzazione dell'atrio sinistro (AS) e la valutazione delle sue dimensioni. Il diametro massimo atriale viene calcolato da un'immagine registrata al momento della massima distensione dello stesso.
- 2) Valutazione con Doppler a codice di colore e pulsato del flusso trans-mitralico. Con questa scansione si può visualizzare il settore di afflusso ventricolare sinistro in asse lungo, con la valvola mitralica al centro

dell'immagine. Si valutano la competenza della valvola e si misurano le onde trans-mitraliche diastoliche, ottimizzando l'allineamento al flusso trans-mitralico in modo da ottenere una buona visione dei picchi di velocità delle onde E ed A.

- 3) Valutazione con Doppler a codice di colore e pulsato a livello del tratto di efflusso ventricolare sinistro, con l'aorta al centro dell'immagine, ottimizzando l'allineamento per la rilevazione del flusso trans-aortico e la misurazione dell'integrale velocità-tempo in sistole.

Per ciascun piano d'immagine, sono stati acquisiti possibilmente tre cicli cardiaci rappresentativi. Tutte le registrazioni sono state salvate come singole immagini o *cineloops* in formato digitale per le successive analisi.

2.1.2.2 Misurazioni e calcoli ecocardiografici

Tutte le misurazioni sono state eseguite *off-line*, da parte di un singolo operatore, sulla base delle immagini acquisite e salvate in formato digitale, utilizzando il pacchetto software dedicato disponibile a corredo dello strumento. Per entrambi i soggetti sono stati misurati possibilmente almeno due cicli cardiaci rappresentativi per ciascuna modalità ecocardiografica, cercando di escludere dall'analisi immagini di scarsa qualità e cicli immediatamente successivi ad una pausa sinusale o ad un blocco atrio-ventricolare di 2°.

La frequenza cardiaca (FC) in battiti per minuto (bpm) di ciascun ciclo misurato è stata calcolata sulla base del tracciato elettrocardiografico.

I parametri ecocardiografici considerati in questo studio includono variabili, sia misurate che calcolate, relative alla funzione sistolica e diastolica VS, derivate dall'esame 2D, M-mode, Doppler e dall'esame PW-

TDI e la misurazione del diametro dell'atrio sinistro (AS) in modalità 2D. Un esempio di misurazione in ciascuna modalità è riportato nella **Tavola II**.

2.1.2.2.1 Misurazioni e calcoli della funzione del VS in M-mode

I parametri M-mode includono variabili lineari in base a cui sono state derivate le variabili di volume e massa e gli indici di funzionalità VS (FA%, FE%). Per le misurazioni del tracciato transventricolare M-mode è stato usato il metodo “*leading edge to leading edge*” sul profilo (Lang RM. et al., 2005).

Le dimensioni lineari misurate (in cm) includono: il diametro interno del ventricolo destro (DVD) alla fine della diastole (DVDd) e della sistole (DVDs), lo spessore del setto interventricolare alla fine della diastole (SIVd) e della sistole (SIVs); il diametro interno del ventricolo sinistro (DVS) alla fine della diastole (DVSd) e della sistole (DVSs); lo spessore della parete libera VS alla fine della diastole (PLVSd) e della sistole (PLVSs). Le misurazioni lineari tele-diastoliche sono state sincronizzate con l'inizio del complesso QRS o con il picco dell'onda R sul tracciato ECG, quando l'onda Q non era riconoscibile. Le misurazioni tele-sistoliche sono state eseguite in corrispondenza del punto di massima escursione delle pareti VS settale e libera VS (**Fig. 2.1.1, Tav.II**).

Le variabili calcolate includono le misure volumetriche (in ml): Volume telediastolico finale (VDF), Volume sistolico finale (VSF) e Volume di eiezione (SV, *Stroke volume*); l'indice di funzionalità M-mode del VS considerato in questo studio è rappresentato dalla frazione di accorciamento (FA %) (Grenacher P. et al., 2010), tuttavia è stata calcolata per completezza dei dati anche la frazione di eiezione (FE%). Le suddette variabili sono calcolate automaticamente dal software, utilizzando le formule previste dal metodo convenzionale di Teicholz.

L'*output* cardiaco (CO) in L/min è stato calcolato con la formula (Boon J., 1998):

$$SV (L) \times FC (bpm).$$

Ulteriori variabili calcolate manualmente sono lo spessore medio della parete libera in sistole (SMPs) ed in diastole (SMPd), ottenute con la formula:

$$SMP (cm) = (PPVS + SIV) / 2.$$

Inoltre, la massa del VS in grammi è stata calcolata utilizzando la seguente formula (Young LE. et al., 2005):

$$\text{massa VS (g)} = 1,04 \times [(DVSd + PLVSd + SIVd)^3 - DVSd^3] - 13,6.$$

2.1.2.2.2 Misurazioni e calcoli della funzione del VS in 2D

Le variabili relative al VS ed alla sua funzione ottenute in modalità 2D includono il VSVs ed il VSVd, lo SV, la FE% ed il CO. Tali parametri sono stati calcolati dal software tramite il metodo Simpson's - *single plane* modificato, sulla base delle seguenti misurazioni manuali: dalla scansione 4 camere parasternale destra ottimizzata per il VS, la superficie endocardica viene tracciata con il calibro elettronico a partire dall'inserzione settale della valvola mitralica fino alla inserzione della stessa sulla parete libera, per il calcolo dell'area ventricolare (VSA), mentre la lunghezza VS (LVS) viene tracciata dalla valvola mitrale all'apice ventricolare. La fine della diastole è stata identificata un frame prima della chiusura della valvola mitralica o all'inizio del complesso QRS, la fine della sistole un frame prima della apertura della valvola mitralica (minima dimensione VS) (**Fig. 2.1.2 e 2.1.3, Tav. II**) (Boon JA., 1998; McConachie E. et al., 2013).

2.1.2.2.3 Misurazioni e calcoli della funzione del VS con Doppler

Il diametro aortico (AoD) è stato misurato manualmente, dalla scansione parasternale destra del tratto di efflusso VS, a livello del seno di

Valsava con il metodo "*trailing edge to leading edge*" (**Fig. 2.1.4, Tav. II**). L'area di sezione dell'aorta (Ao CSA, cross-sectional area) è stata calcolata secondo la formula:

$$Ao\ CSA(cm^2) = [\pi \times (0,5 \times \text{diametro})^2]$$

La velocità massima (Ao Vmax) e l'integrale velocità-tempo del flusso aortico (Ao IVT) vengono fornite automaticamente dal software tracciando col calibro lo spettro Doppler pulsato trans-valvolare in sistole, ottenuto dalla scansione parasternale sinistra in asse lungo (**Fig. 2.1.5, Tav. II**). Lo SV è stato poi calcolato manualmente con la seguente formula:

$$SV\ (ml) = Ao\ CSA \times Ao\ IVT$$

ed il CO come (Blissit KJ. et al., 1997; McConachie E. et al., 2013):

$$CO\ (L/min) = SV(L) \times FC\ (bpm).$$

Per quanto riguarda la valvola mitrale (MV), la velocità massima del picco E (precoce) ed A (tardivo) dell'onda, è stata misurata manualmente con il calibro, sulla base dello spettro Doppler pulsato trans-mitralico in diastole. E' stato poi calcolato il rapporto tra le due velocità: MV E/A.

2.1.2.2.4 Misurazioni e calcoli della funzione del VS con TDI

Per le misurazioni della traccia spettrale PW-TDI, il profilo esterno dell'eco più ampio e con le onde maggiormente riconoscibili è stato misurato utilizzando un settaggio standard del *gain*.

Le variabili PW-TDI misurate (**Fig. 2.1.6-7-8, Tav. II**) includono: 2 variabili di velocità del movimento sistolico della parete libera ventricolare sinistra (S_1 ed S_m); 3 variabili di velocità del movimento diastolico della parete libera VS (E_1 , E_m , A_m), di cui una (A_m), relativa al movimento tele-diastolico della parete libera VS, rappresenta indirettamente la funzionalità dell'atrio sinistro; 3 intervalli di tempo sistolici (PEP, ET, IVCT); 1 intervallo di tempo diastolico (IVRT). Per ciascuna variabile misurata, è

stata calcolata la media dei valori ottenuti dalle singole misurazioni e questa è stata utilizzata per le successive analisi.

Alcuni rapporti tra le variabili sono stati calcolati manualmente: rapporto tra le velocità Em/Am, rapporto tra gli intervalli di tempo PEP/ET ed IVCT/ET. L'indice IPM o Tei è stato calcolato secondo la formula riportata in tabella (**Tabella 2.1.2**).

Tabella 2.1.2. Variabili PW-TDI utilizzate per la valutazione del movimento radiale della parete libera del ventricolo sinistro

<i>Scansione parasternale destra asse corto a livello delle corde tendinee</i>		
Velocità del movimento di parete VS sistolico		
S₁	Velocità di contrazione isovolumetrica	Velocità di picco dell'onda positiva di movimento radiale di parete durante la contrazione isovolumetrica
S_m	Velocità di eiezione	Velocità di picco dell'onda positiva di movimento radiale di parete durante l'eiezione
Intervalli di tempo sistolici		
PEP	Periodo di pre-eiezione	Tempo tra l'inizio del complesso QRS e l'inizio dell'onda S _m
ET	Tempo di eiezione	Tempo dall'inizio alla fine dell'onda S _m (durata S _m)
IVCT	Tempo di contrazione isovolumetrica	Tempo dall'inizio dell'onda S ₁ all'inizio dell'onda S _m
Velocità del movimento di parete VS diastolico		
E₁	Velocità di rilasciamento isovolumetrico	Velocità di picco dell'onda negativa di movimento radiale di parete durante il rilasciamento isovolumetrico
E_m	Velocità diastolica precoce	Velocità di picco dell'onda negativa di movimento radiale di parete durante la fase di riempimento ventricolare rapido
<i>Variabili di funzione attiva dell'atrio sinistro</i>		
A_m	Velocità diastolica tardiva	Velocità di picco dell'onda negativa di movimento radiale di parete durante la sistole atriale
Intervalli di tempo diastolici		
IVRT	Tempo di rilassamento isovolumetrico	Tempo dall'inizio dell'onda E ₁ all'inizio dell'onda E _m
IPM	Indice di performance miocardica	$IPM = (IVCT + IVRT) / ET$

2.1.2.2.5 Misurazione delle dimensioni dell'AS in 2D

Il diametro massimo dell'AS è stato determinato manualmente utilizzando due metodi diversi dalla scansione parasternale destra in asse lungo (Aldx) (**Fig. 2.1.9 e 2.1.10, Tav. I**) e dalla scansione parasternale

destra in asse corto (Acdx), come descritto in tabella e dalla scansione parasternale sinistra in asse lungo (Alsn) (**Tabella 2.1.3**) (Schwarzwald CC. et al., 2007).

Tabella 2.1.3. Misurazioni utilizzate per la valutazione del diametro massimo dell'atrio sinistro (AS) in modalità 2D

<i>Scansione parasternale destra asse lungo (Aldx)</i>	
AS D Aldx	Massima distanza parallelamente alla valvola mitralica tra la parete settale (inner edge) e lo strato pericardico (parete libera); un frame prima dell'apertura della valvola mitrale
<i>Scansione parasternale destra asse corto (Acdx)</i>	
Ao D Acdx	Diametro interno (inner edge) dell'aorta misurata dal punto di mezzo del seno aortico destro alla commissura tra la cuspidi coronarica sinistra e la non coronarica
AS D1 Acdx	Diametro interno (inner edge) misurato prolungando la linea Ao D fino alla parete atriale opposta; un frame dopo la chiusura della valvola aortica
AS D2 Acdx	Diametro interno (inner edge) dalla giunzione del setto atriale con l'aorta alla parete libera atriale, lungo la linea che divide il corpo dell'atrio decorrendo perpendicolarmente alla parete libera; un frame dopo la chiusura della valvola aortica
<i>Scansione parasternale sinistra asse lungo (Alsn)</i>	
AS D Alsn	Massima distanza parallelamente alla valvola mitralica tra la parete settale (inner edge) e lo strato pericardico (parete libera); un frame prima dell'apertura della valvola mitrale.

2.1.2.2.6 Misurazioni del flusso polmonare e tricuspidalico

Seppur non utilizzate ai fini delle valutazioni di interesse per questo studio, per completezza dell'esame ecocardiografico sono state misurate manualmente, la velocità massima del flusso polmonare (PV Vmax) e la velocità massima del picco E (precoce) ed A (tardivo) del flusso trans-tricuspidalico, sulla base dei rispettivi spettri Doppler pulsato in sistole ed in diastole.

2.2 RISULTATI

La valutazione ecocardiografica è stata eseguita a tutti gli intervalli di tempo prestabiliti nel corso della gravidanza in entrambi i soggetti inclusi nello studio. Complessivamente sono stati eseguiti 10 esami ecocardiografici per ciascuna delle due fattrici, di cui l'ultimo due giorni e cinque giorni prima del parto rispettivamente nella fattrice 1 e 2.

Durante ciascun esame ecocardiografico è stato possibile acquisire le immagini tramite tutte le modalità di *imaging*, fatta eccezione per l'impossibilità di eseguire la valutazione TDI in due casi per ciascuna fattrice (vedi paragrafo 2.2.5 Variabili TDI).

Per ciascun esame sono state prese in considerazione in totale 60 variabili, così distribuite: 17 variabili M-mode, 14 variabili 2D, 11 variabili PW-Doppler e 13 variabili PW-TDI. Tali variabili, con i relativi valori per ciascun soggetto, sono riportate in una tabella per ciascuna modalità d'indagine: M-mode, 2D, Doppler di flusso e TDI. In ogni tabella, i valori ottenuti per ciascuna variabile ecocardiografica sono stati riportati come valori singoli ed analizzati in maniera descrittiva, utilizzando un programma commerciale (Microsoft Excel 2010), al fine di valutare la variazione in funzione dell'età gestazionale di ciascun parametro, considerando ciascun soggetto singolarmente.

Relativamente ai singoli valori ottenuti, si può affermare che sia tutte le variabili misurate che le variabili derivate risultano all'interno dei *range* di riferimento fisiologici per la razza Trottatore, ove riportati in letteratura.

2.2.1 Frequenza cardiaca

In entrambe le fattrici, la frequenza cardiaca risulta complessivamente

aumentare, seppure non linearmente, nel corso della gravidanza, con un incremento più rapido dal XIII mese (241-270 giorni), fino quasi a raddoppiare il valore basale (dati non riportati).

2.2.2 Variabili M-mode

Le variabili misurate e calcolate derivate dall'esame M-mode, con i rispettivi valori ottenuti a ciascun intervallo di tempo per ciascuna fattrice sono riportate nella seguente tabella (Tabella 2.2.1).

	Giorni di gravidanza									
	pre-FA	40	90-100	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
FC (bpm)	40	75	34	34	36	37	40	53	51	62
	35	47	49	54	36	43	48	52	46	59
Variabili ventricolo destro (VD)										
VDDd (cm)	3,6	3,3	3,8	3,7	4,6	3,5	4,0	3,2	4,6	3,9
	3,8	3,8	4,5	3,6	4,4	4,1	4,6	5,5	5,5	4,5
VDDs (cm)	nd	2,8	nd	3,1	3,8	2,3	2,9	2,6	3,0	3,4
	2,3	1,9	2,7	1,7	2,7	2,6	2,9	3,0	2,8	2,6
Variabili ventricolo sinistro (VS)										
SIVd (cm)	2,9	2,5	2,3	3,2	3,2	2,5	2,7	2,5	3,3	3,2
	3,3	2,1	2,9	2,3	3,3	3,3	3,2	3,0	3,3	3,0
VSDd (cm)	11,1	11,3	11,4	10,9	10,6	10,1	12,1	12	11,1	11,5
	9,7	10,7	9,9	11,3	10,0	11,6	9,5	10,3	9,5	11,2
VSPLd (cm)	2,4	2,5	2,0	2,0	2,7	1,9	2,0	2,1	2,1	2,1
	2,3	1,9	2,3	2,7	2,4	2,4	1,7	1,9	2,1	2,4
SIVs (cm)	4,4	4,2	4,7	4,5	4,7	4,4	4,8	4,9	4,2	4,4
	4,2	4,0	4,3	4,6	4,0	4,0	3,9	3,5	4,3	3,5
VSDs (cm)	6,6	7,1	6,4	6,6	6,2	5,5	6,7	6,7	7,0	6,9
	6,8	6,0	6,1	6,1	7,2	8,3	6,3	6,7	5,8	8,4
VSPLs (cm)	4,3	2,8	3,6	3,7	4,4	3,6	3,7	3,8	3,8	2,9
	3,2	3,5	3,1	3,8	3,5	2,7	2,3	3,2	3,5	2,8
VS FA%	41	37	44	39	42	46	44	44	37	40
	30	44	38	46	28	28	33	35	39	25
VS FE%	68	64	73	67	70	75	73	72	65	68
	55	73	66	75	52	52	60	61	67	47
VDF (ml)	709	737	752	682	641	577	855	840	709	766
	522	655	546	737	561	780	500	602	500	723
VSF (ml)	224	266	205	224	193	147	234	234	251	246
	235	180	186	185	271	378	201	234	165	382
SV (ml)	485	471	547	458	448	430	621	606	458	520
	287	475	360	552	290	402	299	368	335	341
CO (L/min)	19	35	19	16	16	16	25	32	23	32
	10	22	18	30	10	17	14	19	15	20
VS MASSA (g)	3151	2982	2424	3037	3394	2066	2997	2964	3202	3275
	2711	2030	2587	3048	2949	3673	2198	2546	2512	3266
SMPd(cm)	2,7	2,5	2,1	2,6	2,9	2,2	2,3	2,3	2,7	2,6
	2,8	2,0	2,6	2,5	2,8	2,8	2,5	2,5	2,7	2,7
SMPs(cm)	4,3	3,5	4,2	4,1	4,5	4,0	4,2	4,3	4,0	3,7
	3,7	3,7	3,7	4,2	3,7	3,4	3,1	3,3	3,9	3,1

Tabella 2.2.1. Variabili derivate dall'esame M-mode trans-ventricolare, eseguito in scansione parasternale destra, asse corto. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico è riportato come intervallo in giorni di gravidanza; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione. Per ciascuna variabile sono riportati i valori relativi alla fattrice 1 (linea colorata) ed alla fattrice 2 (linea neutra). FC, in battiti per minuto, è la frequenza cardiaca istantanea, relativa al tracciato M-mode analizzato per il calcolo dell'Output cardiaco. VD: ventricolo destro, VS: ventricolo sinistro, d: fase diastolica, s: fase sistolica, nd: non determinato. **Variabili misurate:** VDDd (cm): diametro VD in diastole (in cm), VDDs (cm): diametro VS in sistole, SIVd (cm): spessore setto interventricolare in diastole, SIVs (cm): spessore setto interventricolare in sistole, VSDd: diametro VS in diastole, VSPLd (cm): spessore parete libera VS in diastole, VSDs (cm): diametro VS in sistole, VSPLs (cm): spessore parete libera VS in sistole. **Variabili calcolate:** VS FA%: frazione di accorciamento VS, VS FE%: frazione di eiezione VS, VDF (ml): volume diastolico finale, VSF (ml): volume sistolico finale, SV (ml): stroke volume o volume di eiezione, CO (L/min): output cardiaco o portata, VS MASSA (g): massa VS, SMPd (cm): spessore medio parete in diastole, SMPs (cm): spessore medio parete in sistole.

Delle 17 variabili considerate, 8 (48%) rappresentano misure lineari mentre 9 sono parametri calcolati (52%), come elencati in dettaglio nella didascalia. Delle 340 variabili totali, solo 2 (VDDs agli intervalli pre-FA, ovvero prima della fecondazione e 90-100 giorni della fattrice 1) non sono state determinate, a causa di un tracciato inadeguato per la precisa misurazione del diametro del VD in sistole. Complessivamente è stato quindi possibile analizzare il 99,6% delle variabili M-mode ed il 100% di quelle relative al VS.

Per nessuna delle variabili misurate è individuabile un *trend* coerente di variazione con l'avanzare della gravidanza. Analogamente per le variabili calcolate FE%, SMP e VS massa. Tale riscontro è sovrapponibile per le due fattrici.

L'andamento delle principali variabili funzionali del VS è raffigurato in istogramma per la fattrice 1 (**Grafico 2.2.1**).

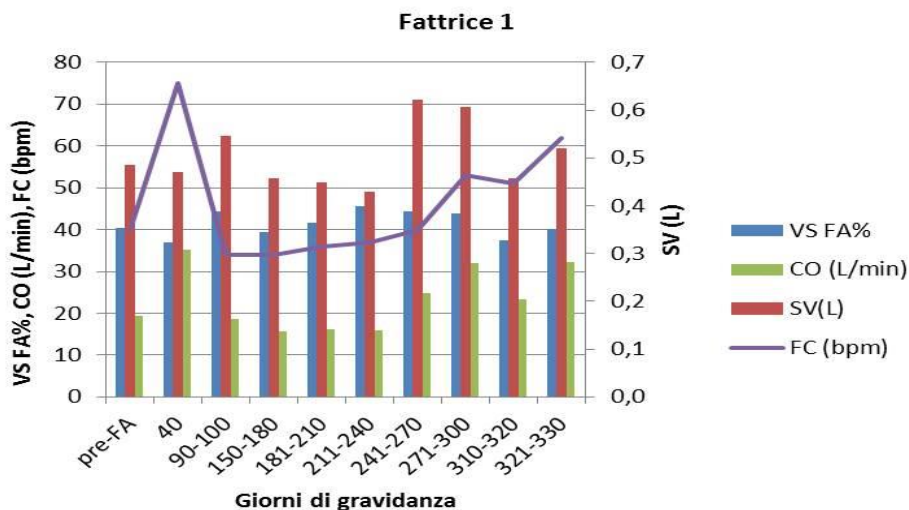


Grafico 2.2.1 Funzione sistolica del ventricolo sinistro (VS) basata sull'esame M-mode in corso di gravidanza nella fattrice 1. L'andamento della frequenza cardiaca (FC) è rappresentato dalla linea continua. VS FA%: frazione di accorciamento VS, SV (L): stroke volume o volume di eiezione, CO (L/min): Output cardiaco o portata. La rispettiva scala dei valori per ciascuna variabile è riportata sui due assi verticali. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico nel corso della gravidanza è riportato come intervallo in giorni sull'asse orizzontale; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione.

A fronte di un incremento nel tempo della FC (il valore al tempo 40 giorni è da considerarsi casuale), mentre FA (%) sembra mantenersi

abbastanza costante, il CO mostra un netto andamento in crescita nella II metà della gravidanza e coerente in ogni punto con la FC; lo SV non mostra un *trend* evidente, forse in crescita negli ultimi mesi e sembra contribuire maggiormente al CO a valori di FC più bassi. Il quadro del CO è riscontrabile in modo analogo nella fattrice 2, seppur FA e SV sembrano variare in modo più concorde tra loro ed un trend in crescita nella II metà di gestazione è lievemente più riconoscibile.

2.2.3 Variabili 2D

Sono riportate le variabili derivate dall'esame 2D, con i rispettivi valori ottenuti a ciascun tempo per ciascuna fattrice (**Tabella 2.2.2**).

Delle 14 variabili considerate, 7/14 sono relative al VS e di queste il 28% (2/7) rappresentano misurazioni (VSLd, VSLs), mentre il 72% (5/7) sono parametri calcolati; 6/14 sono relative all'AS, di cui l'83% (5/6) sono misurate ed 1 è calcolata; infine 1 variabile misurata è relativa al diametro aortico in asse lungo (Ao D Aldx). Delle 280 variabili totali, il 3% (9/280) non sono state determinate, di cui 4/9 relative alla misura del diametro AS in scansione Acdx e Alsn (con conseguente impossibilità di calcolare As/Ao in 1 caso) e 4/9 relative alla misura del diametro aortico in asse lungo (Ao D Aldx), con conseguente impossibilità di calcolare il rispettivo parametro Ao CSA (vedi paragrafo 2.2.4 Variabili Doppler). In tutti i casi la causa era la qualità dell'immagine inadeguata per eseguire la misurazione in maniera accurata.

Complessivamente è stato quindi possibile analizzare il 96,8% delle variabili 2D ed il 100% di quelle relative al VS.

Variabili VS	Giorni di gravidanza									
	pre-FA	40	90-100	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
FC (bpm)	54	32	34	32	33	36	41	49	48	55
VSLd (cm)	39	44	42	69	37	44	53	55	56	58
VSLs (cm)	17,1	18,0	15,8	16,1	16,0	16,2	17,3	16,6	16,4	16,5
VDF (ml)	17,2	16,8	18,3	15,6	15,0	17,8	16,7	17,1	16,2	17,6
VSF (ml)	11,7	11,9	11,5	11,2	11,1	11,6	11,8	12,1	11,3	12,2
SV (ml)	11,0	12,7	12,7	11,0	9,0	12,4	10,9	10,8	10,4	11,3
FE %	1381	1464	1102	1198	1160	1240	1318	1376	1318	1262
CO (L/min)	1209	1082	1211	1225	894	1214	1161	1322	1161	1347
	342	369	288	328	252	400	449	535	353	544
	336	343	392	216	309	335	383	327	354	387
	1034	1095	812	872	908	843	869	837	962	716
	871	742	820	1006	585	880	782	995	809	961
	75	75	74	73	78	68	66	61	73	57
	72	68	68	82	66	72	67	75	70	71
	56	35	28	28	30	30	36	41	46	39
	34	33	34	69	22	39	41	55	45	56
Variabili AS										
AS D Aldx (cm)	10,3	11,7	11,4	11,1	11,8	11,5	12	11,7	12,3	12,3
AS D1 Acdx (cm)	10,9	10,5	11,0	11,3	10,2	11,2	11,2	11,5	11,5	11,3
AS D2 Acdx (cm)	9,6	9,6	9,7	10,3	10,2	10,7	10,7	10,5	nd	10,4
AoD Acdx (cm)	9,3	8,4	10,2	9,0	8,8	10,4	10,6	10,7	10,8	10,6
AS/Ao Acdx	nd	9,6	11,0	11,0	10,9	11,0	11,3	11,3	nd	11,2
AS/Ao Acdx	9,6	9,3	10,5	10,9	9,3	10,6	11,3	10,4	10,3	11,3
AS D Alsn (cm)	8,2	8,0	8,2	7,6	8,3	8,3	7,5	7,8	8,1	7,8
	7,8	6,6	6,8	7,1	7,0	7,3	7,5	6,8	6,9	7,6
	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,3	1,4	1,3	nd	1,3
	1,2	1,3	1,5	1,3	1,3	1,4	1,4	1,6	1,6	1,4
	nd	10,7	11,1	12,2	12,1	12,0	12,0	12,2	12,0	11,4
	10,8	11,1	11,3	11,6	11,3	11,3	11,4	11,4	11,0	11,1
Diametro Aorta										
Ao D Aldx (cm)	8,3	nd	7,9	8,6	8,5	8,3	8,6	nd	7,8	8,1
	7,1	6,9	nd	7,7	7,4	6,9	nd	6,8	6,9	6,7

Tabella 2.2.2 Variabili derivate dall'esame bidimensionale. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico è riportato come intervallo in giorni di gravidanza; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione. Per ciascuna variabile sono riportati i valori relativi alla fattrice 1 (linea colorata) ed alla fattrice 2 (linea neutra). FC, in battiti per minuto, è la frequenza cardiaca istantanea, relativa all'immagine 2D del ventricolo sinistro analizzata per il calcolo dell'Output cardiaco. Le variabili relative al ventricolo sinistro (VS) sono state ottenute dalle immagini in scansione parasternale destra, asse lungo. d: fase diastolica, s: fase sistolica, nd: non determinato. **Variabili misurate:** VSLd (cm): lunghezza VS in diastole, VSLs (cm): lunghezza VS in sistole. **Variabili calcolate:** VDF (ml): volume diastolico finale VS, VSF (ml): volume sistolico finale VS, SV (ml): stroke volume o volume di eiezione VS, FE%: frazione di eiezione VS, CO (L/min): Output cardiaco o portata. Le variabili relative all'atrio sinistro (AS) sono state ottenute dalla scansione parasternale destra asse lungo (Aldx), parasternale destra asse corto (Acdx) e parasternale sinistra asse lungo (Alsn). **Variabili misurate:** AS D Aldx (cm): diametro AS in scansione Aldx, AS D1 Acdx (cm): diametro 1 AS in scansione Acdx, AS D2 Acdx (cm): diametro 2 AS in scansione Acdx, AoD Acdx (cm): diametro aorta in scansione Acdx, AS D Alsn (cm): diametro AS in scansione Alsn. **Variabile calcolata:** AS/Ao Acdx: rapporto dei diametri AS/Ao dalla scansione Acdx. **Ao D Aldx (cm):** diametro aorta in scansione Aldx, per il calcolo di Ao CSA (vedi variabili Doppler).

Per quanto riguarda i parametri morfo-funzionali del VS, la lunghezza in sistole (VSLs) ed in diastole (VSLd) non sembra mostrare una variazione sostanziale nel corso della gravidanza in nessuna delle due fattrici.

Le variabili di volume VS in funzione del tempo sono rappresentate in istogramma per la fattrice 1 (**Grafico 2.2.2**) e 2 (**Grafico 2.2.3**).

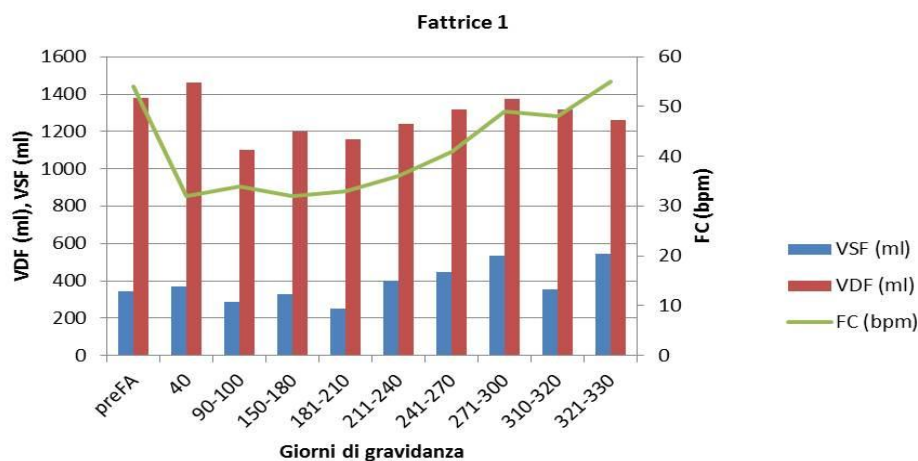


Grafico 2.2.2 Volume del ventricolo sinistro (VS) in sistole ed in diastole basato sull'esame bidimensionale in corso di gravidanza nella fattrice 1. L'andamento della frequenza cardiaca (FC) è rappresentato dalla linea continua. VSF (ml): volume sistolico finale VS, VDF (ml): volume diastolico finale VS. La rispettiva scala dei valori per ciascuna variabile è riportata sui due assi verticali. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico nel corso della gravidanza è riportato come intervallo in giorni sull'asse orizzontale; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione.

Nella fattrice 1, il volume diastolico finale (VDF) non sembra subire importanti variazioni di entità dall'inizio alla fine della gravidanza ma sembra mostrare un lieve *trend* in crescita nella II metà, dopo una riduzione alla fine del I trimestre. Si nota una certa concordanza con la FC istantanea nella direzione della variazione a ciascun tempo, eccetto al tempo 40 giorni; il volume sistolico finale (VSF) presenta complessivamente un aumento circa del 60% dal tempo pre-FA al tempo 321-330 giorni di gestazione, che si realizza sostanzialmente nella II metà di gravidanza e sembra presentare anch'esso una tendenza a variare in maniera coerente con la FC.

Il picco della FC istantanea al tempo pre-FA è da considerarsi casuale.

Nella fattrice 2, il VDF ha un andamento sovrapponibile alla fattrice 1 anche se la fase di crescita è più tardiva (da 211-240 giorni); il VSF non subisce sostanziali variazioni tra l'inizio e la fine della gravidanza, tuttavia anch'esso sembra mostrare una temporanea riduzione (150-180 giorni) prima di riportarsi intorno ai valori iniziali nella II metà della gravidanza.

Il picco della FC istantanea al tempo 150-180 giorni è da considerarsi casuale.

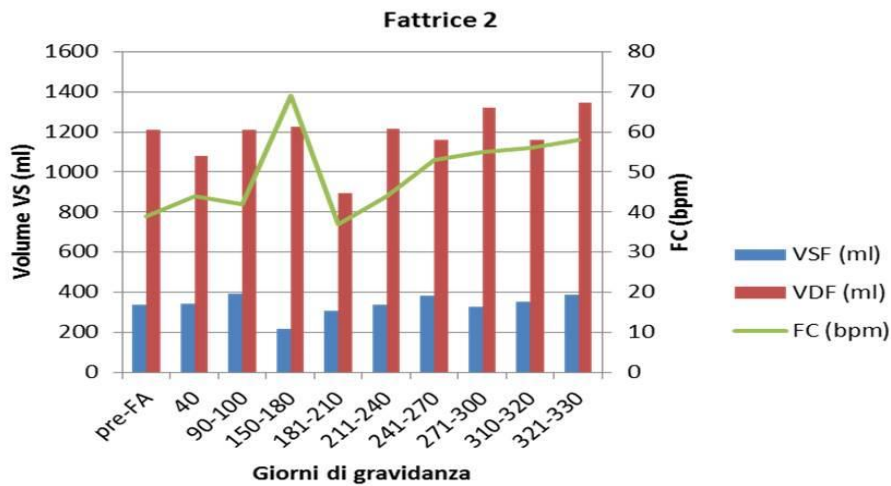


Grafico 2.2.3 Volume del ventricolo sinistro (VS) in sistole ed in diastole basato sull'esame bidimensionale in corso di gravidanza nella fattrice 2. L'andamento della frequenza cardiaca (FC) è rappresentato dalla linea continua. VSF (ml): volume sistolico finale VS, VDF (ml): volume diastolico finale VS. La rispettiva scala dei valori per ciascuna variabile è riportata sui due assi verticali. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico nel corso della gravidanza è riportato come intervallo in giorni sull'asse orizzontale; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione.

In istogramma sono riportate le variabili funzionali 2D del VS relative alla fattrice 1 (**Grafico 2.2.4**).

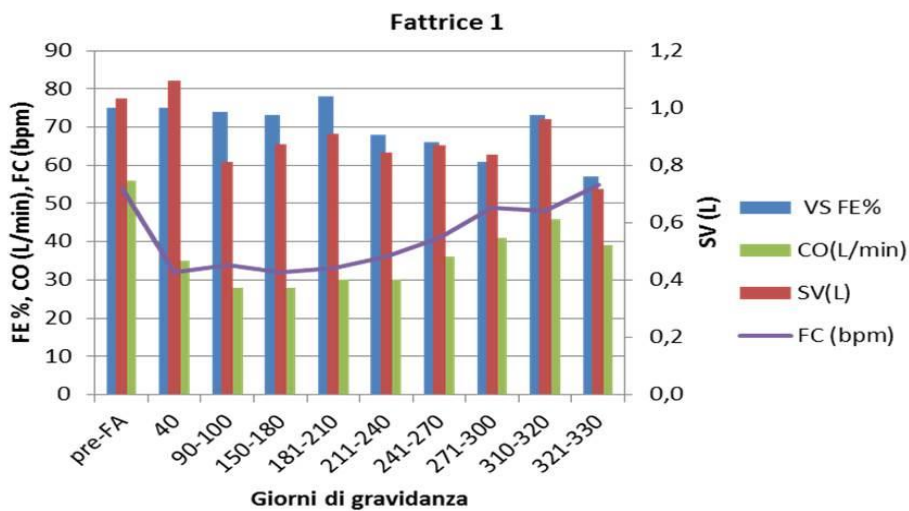


Grafico 2.2.4 Funzione sistolica del ventricolo sinistro (VS) basata sull'esame bidimensionale in corso di gravidanza nella fattrice 1. L'andamento della frequenza cardiaca (FC) è rappresentato dalla linea continua. VS FE%: frazione di eiezione VS, SV (L): stroke volume o volume di eiezione, CO (L/min): Output cardiaco o portata. La rispettiva scala dei valori per ciascuna variabile è riportata sui due assi verticali. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico nel corso della gravidanza è riportato come intervallo in giorni sull'asse orizzontale; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione.

Si noti come, a fronte di un progressivo aumento della FC, lo SV e la FE complessivamente vadano incontro ad una riduzione abbastanza netta, seppur non lineare, negli ultimi mesi di gestazione e come questi varino in maniera concorde tra loro ad eccezione del tempo 90-100 giorni, in cui lo SV presenta una prima più importante riduzione. Il CO presenta un *trend* in aumento, particolarmente evidente a partire dall'VIII mese e tale aumento sembra essere concorde con l'andamento della FC.

Nel caso della fattrice 2, il CO mostra lo stesso tipo di variazione nel corso della gravidanza rispetto alla fattrice 1; lo SV e la FE, seppur piuttosto variabili, non sembrano complessivamente mostrare sostanziali variazioni di entità dall'inizio alla fine; tuttavia, lo SV subisce una riduzione al tempo 180-210 giorni prima di ritornare circa ai livelli pari o poco superiori all'inizio nel corso degli ultimi mesi di gestazione.

Relativamente alle dimensioni dell'atrio sinistro, si osserva un incremento, seppur non lineare, del diametro della camera (AS D) rilevabile in tutte le modalità di misurazione ed in entrambe le fattrici. Si riportano nel grafico le misurazioni dell'AS per la fattrice 1 (**Grafico 2.2.5**).

Alcuni valori discordanti con il *trend* in aumento riscontrabili in tutte le misurazioni, sono imputabili ad una sottostima per errore nella misurazione manuale, dovuto a scarsa visualizzazione della parete atriale.

Si noti, tuttavia, che a fronte di un andamento in crescita dell' AS D rilevato in tutte le modalità, si riscontra una differenza sensibile nel valore assoluto (cm) di tale diametro tra le suddette modalità; la misurazione in asse lungo da destra (AS D Aldx) sembrerebbe fornire il valore più elevato insieme a quella in asse lungo da sinistra (AS D Alsn), fatta eccezione per l'esame al tempo 321-330 giorni.

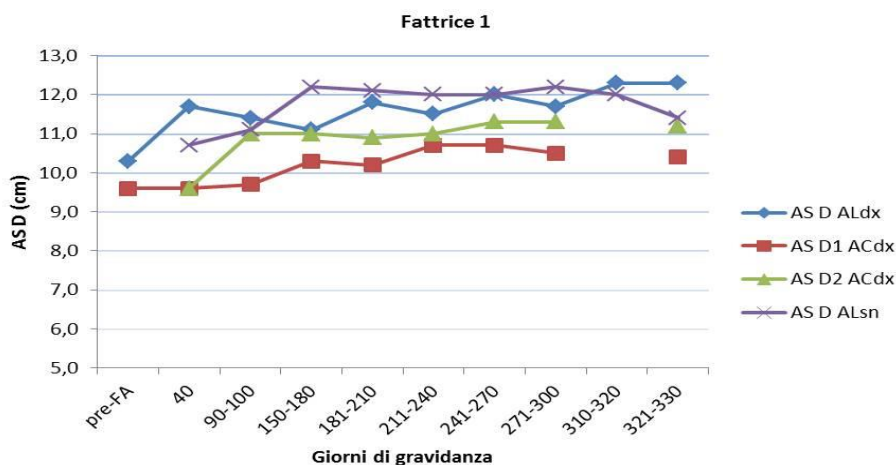


Grafico 2.2.5 Dimensioni dell'atrio sinistro (AS) basate sull'esame bidimensionale in corso di gravidanza nella fattrice 1. Nel grafico a linee è rappresentato l'andamento delle variabili relative al diametro dell'AS derivate dall'esame in 2D nelle diverse scansioni. AS D Aldx: diametro AS dalla scansione parasternale destra asse lungo, AS D1 Acdx: diametro 1 AS dalla scansione parasternale destra asse corto, AS D2 Acdx: diametro 2 AS dalla scansione parasternale destra asse corto, AS D ALsn: diametro AS dalla scansione parasternale sinistra asse lungo. La scala dei valori per ciascuna variabile è riportata sull'asse verticale. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico nel corso della gravidanza è riportato come intervallo in giorni sull'asse orizzontale; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione.

Relativamente alla determinazione del diametro aortico in asse lungo (Ao D Aldx) in 2 esami per ciascuna fattrice non è stato possibile effettuare la misurazione per la mancanza di una scansione adeguata a tal fine. Si noti dalla tabella una certa variabilità nella misurazione di tale parametro nei due soggetti.

2.2.4 Variabili Doppler

Le variabili misurate e calcolate derivate dall'esame Doppler di flusso ad onda pulsata, con i rispettivi valori ottenuti a ciascun intervallo di tempo per ciascuna fattrice sono riportate nella tabella (**Tabella 2.2.3**).

Sono state prese in considerazione in totale 11 variabili, di cui 6 relative ai flussi sistolici e 5 a quelli diastolici; delle prime, 3/6 variabili (50%) sono misurate, mentre delle diastoliche 4/5 (80%) sono misurate ed 1 calcolata, come indicato in didascalia.

	Giorni di gravidanza									
	pre-FA	40	90-100	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
Variabili Doppler sistoliche										
FC (bpm)	82	33	33	34	67	41	45	42	52	56
	37	46	37	57	40	51	60	52	55	55
Ao IVT (cm)	nd	23,1	30,5	nd	34,3	25,4	26,4	15,2	15,7	18,8
	19,2	22,3	41,7	42	23,2	31,7	20,2	32,4	38,1	23,7
Ao Vmax (cm/s)	113,0	81,4	80,5	100,0	80,8	81,8	96,9	73,2	60,1	81,6
	65,4	113	88,7	199	80,4	105	70,6	136	137	82,7
Ao CSA (cm²)	54,1	nd	49	58,1	56,7	54,1	58,1	nd	47,8	51,5
	39,6	37,4	nd	46,6	43	37,4	nd	36,3	37,4	35,3
SV (ml)	nd	nd	1495	nd	1945	1374	1534	nd	750	968
	760	834	nd	1957	998	1186	nd	1176	1425	837
CO (L/min)	nd	nd	49	nd	130	56	69	nd	39	54
	28	38	nd	112	40	60	nd	61	78	46
PV Vmax (cm/s)	89,5	62,6	68,5	77,9	63,2	85,1	82,1	77,4	75,7	82,4
	85,3	116	87,6	111	89,5	103	78,1	82,3	105	107
Variabili Doppler diastoliche										
MV E (cm/s)	80,0	55,0	55,9	69,7	48,4	51,1	75,8	61,3	48,3	38,3
	nd	nd	70,6	87,1	54,9	70,6	53,2	62,5	72,5	75,2
MV A (cm/s)	44,5	26,0	27,9	36,1	24,6	38,1	47,9	36,6	48,5	57,0
	nd	nd	nd	nd	47,6	36,8	nd	44,3	61,5	53,2
MV E/A	1,8	2,1	2,0	1,9	2,0	1,3	1,6	1,7	1,0	0,7
	nd	nd	nd	nd	1,2	1,9	nd	1,4	1,2	1,4
TV E (cm/s)	54,5	59,5	46,8	54,2	64,1	56,1	nd	63,4	nd	44,2
	nd	nd	76,7	88,6	59,6	70,2	51,5	54,1	nd	67
TV A (cm/s)	45,9	42,7	27,9	54,9	27,9	27,2	nd	45,9	35,2	34,2
	nd	nd	nd	nd	38,7	52,4	38,9	46,9	60,9	55,2

Tabella 2.2.3 Variabili derivate dall'esame Doppler ad onda pulsata. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico è riportato come intervallo in giorni di gravidanza; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione. Per ciascuna variabile sono riportati i valori relativi alla fattrice 1 (linea colorata) ed alla fattrice 2 (linea neutra). FC, in battiti per minuto, è la frequenza cardiaca istantanea, relativa allo spettro Doppler del flusso aortico analizzato per il calcolo dell'Output cardiaco. nd: non determinato. **Variabili Doppler sistoliche:** Ao: valvola aorta, PV: valvola polmonare. **Variabili misurate:** Ao Vmax (cm/s): velocità massima flusso trans-aortico, PV Vmax (cm/s): velocità massima flusso trans-polmonare. **Variabili calcolate:** Ao IVT (cm): integrale velocità-tempo del flusso aortico, Ao CSA (cm²): area di sezione Ao, SV (ml): stroke volume o volume di eiezione, CO (L/min): Output cardiaco o portata. **Variabili Doppler diastoliche:** MV: valvola mitrale, TV: valvola tricuspide. **Variabili misurate:** MV E (cm/s): velocità massima picco E (proto-diastolico) del flusso trans-mitralico, MV A (cm/s): velocità massima picco A (pre-sistolico) del flusso trans-mitralico, TV E (cm/s): velocità massima picco E (proto-diastolico) del flusso trans-tricuspidale, TV A (cm/s): velocità massima picco A (pre-sistolico) del flusso trans-tricuspidale. **Variabili calcolate:** MV E/A: rapporto delle velocità picco E/A.

Nel complesso, è stato possibile misurare l'82% (180/220) del totale delle variabili, così distribuito: l'85% delle variabili sistoliche ed il 78 % delle diastoliche, 86% (121/140) delle variabili misurate, 73% (59/80) delle calcolate.

Delle 18 variabili sistoliche non determinate, 2/18 (11 %) sono relative alla misurazione dell'IVT dell'aorta nella fattrice 1 (pre-FA, 150-180 giorni), dovute alla impossibilità di tracciare il profilo dell'onda aortica in maniera accurata dallo spettro, per cui è stato possibile valutarne solo la Vmax; 4/18 sono relative alla misurazione dell'area dell'aorta (Ao CSA) in entrambe le fattrici. Da notare che quest'ultimo parametro (calcolato) deriva dalla misurazione 2D del diametro aortico (Ao D Aldx), ma viene considerato insieme alle variabili Doppler in quanto finalizzato alla determinazione dello SV (e CO) con tale metodo (vedi Tabella 2.2.2). La mancanza dei suddetti parametri rende ragione delle 12/18 (66%) variabili derivate che non sono state determinate (SV, CO).

Delle 22 variabili diastoliche non determinate, 7/22 (32 %) sono misurate e relative alla misurazione della velocità delle onde E (2/7) ed A (5/7) del flusso trans-mitralico (MV) nella sola fattrice 2, di conseguenza in 5 casi non è stato determinato il rapporto E/A; altre 9/22 variabili (40 %) sono misure della velocità delle onde E (5/9) ed A (4/9) del flusso trans-tricuspidalico nelle fattrici 1 e 2. In tutti i casi i picchi non erano distinguibili nello spettro Doppler.

Complessivamente non è riconoscibile alcun tipo di andamento nel tempo per le variabili flussimetriche del tratto di efflusso del VS considerate; si osserva invece una riduzione, seppur non lineare, della velocità del picco MV E nel corso della gravidanza nella fattrice 1, pari al 50 % tra il tempo pre-FA e 321-330 giorni; si riscontra inoltre una riduzione

del rapporto E/A fino a valori <1 , giustificata anche dall'aumento della velocità del picco A, in particolare nella II metà della gravidanza (**Grafico 2.2.6**). Nel caso della fattrice 2, tale quadro non è evidente, forse almeno in parte in ragione delle diverse misurazioni non eseguite, ad eccezione di un apparente analogo aumento dell'onda A.

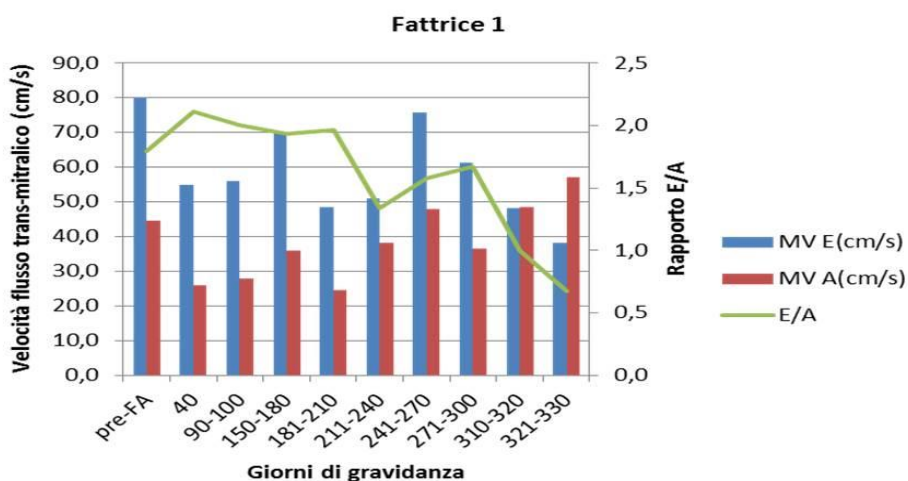


Grafico 2.2.6 Velocità massima delle onde E ed A del flusso trans-mitralico basate sull'esame Doppler in corso di gravidanza nella fattrice 1. MV E (cm/s): velocità massima dell'onda E (proto-diastolica), MV A (cm/s): velocità massima dell'onda A (tele-diastolica). L'andamento del rapporto calcolato tra le due velocità (E/A) è rappresentato dalla linea continua. La rispettiva scala dei valori per ciascuna variabile è riportata sui due assi verticali. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico nel corso della gravidanza è riportato come intervallo in giorni sull'asse orizzontale; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione.

Le variabili di flusso polmonare e tricuspidalico non sono considerate nelle analisi ai fini del presente studio, tuttavia non mostrano variazioni significative.

2.2.5 Variabili TDI

Le variabili misurate e calcolate derivate dall'esame TDI ad onda pulsata, eseguito a livello della parete libera del ventricolo sinistro (VS PL), con i rispettivi valori ottenuti a ciascun intervallo di tempo per ciascuna fattrice sono riportate in tabella (**Tabella 2.2.4**).

		Giorni di gravidanza									
		pre-FA	40	90-100	150-180	181-210	211-240	241-270	271-300	310-320	321-330
FC (bpm)	61	nd	34	33	33	nd	40	47	50	59	
	nd	37	35	51	38	43	48	56	nd	59	
Variabili TDI sistoliche											
<i>Velocità movimento sistolico PLVS</i>											
S1 (cm/s)	11,9	nd	6,7	7,5	nd	nd	9,9	5,3	7,2	7,4	
	nd	9,0	6,8	nd	6,6	5,2	nd	5,5	nd	6,6	
Sm (cm/s)	11,4	nd	9,7	10,1	9,3	nd	10,8	12,8	10,0	10,0	
	nd	12,5	12,3	14,4	10,0	11,5	11,2	14,8	nd	12,4	
<i>Intervallo di tempo sistolico</i>											
ET (sec)	0,455	nd	0,46	0,455	0,433	nd	0,455	0,413	0,4	0,417	
	nd	0,440	0,470	0,405	0,422	0,426	0,264	0,373	nd	0,373	
PEP (sec)	0,125	nd	0,133	0,125	0,126	nd	0,105	0,105	0,115	0,092	
	nd	0,104	0,100	0,093	0,121	0,092	0,095	0,092	nd	0,111	
PEP/ET	0,27	nd	0,29	0,27	0,29	nd	0,23	0,25	0,29	0,22	
	nd	0,24	0,21	0,23	0,29	0,22	0,36	0,25	nd	0,30	
IVCT (sec)	0,055	nd	0,080	0,055	nd	nd	0,045	0,050	0,045	0,053	
	nd	0,039	0,090	nd	0,037	0,030	nd	0,046	nd	0,060	
IVCT/ET	0,12	nd	0,17	0,12	nd	nd	0,10	0,12	0,11	0,13	
	nd	0,09	0,19	nd	0,09	0,07	nd	0,12	nd	0,16	
Variabili TDI diastoliche											
<i>Velocità movimento diastolico PLVS</i>											
E1 (cm/s)	7,7	nd	6,3	7,0	4,8	nd	7,9	9,2	8,0	8,6	
	nd	nd	5,9	nd	nd	7,4	nd	8,0	nd	9,2	
Em (cm/s)	30,3	nd	21,3	28,6	17,6	nd	23,6	22,4	24,3	17,0	
	nd	36,7	14,6	19,3	17,6	18,3	15,4	19,7	nd	26,7	
Am (cm/s)	12,3	nd	14,1	9,6	12,6	nd	12,1	13,9	9,7	10,6	
	nd	7,7	11,8	11,4	6,0	11,6	7,4	6,8	nd	10,9	
Em/Am	2,5	nd	1,5	3,0	1,4	nd	2,0	1,6	2,5	1,6	
	nd	4,8	1,2	1,7	2,9	1,6	2,1	2,9	nd	2,4	
<i>Intervallo di tempo diastolico</i>											
IVRT (sec)	0,040	nd	0,066	0,040	0,080	nd	0,060	0,044	0,050	0,049	
	nd	0,039	0,095	nd	nd	0,039	nd	0,056	nd	0,046	
IPM	0,21	nd	0,32	0,21	nd	nd	0,23	0,23	0,24	0,24	
	nd	0,18	0,39	nd	nd	0,16	nd	0,27	nd	0,28	

Tabella 2.2.4 Variabili derivate dall'esame Doppler tissutale (TDI) ad onda pulsata, eseguito in scansione parasternale destra, asse corto, a livello della parete libera (PL) del ventricolo sinistro (VS). L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico è riportato come intervallo in giorni di gravidanza; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione. Per ciascuna variabile sono riportati i valori relativi alla fattrice 1 (linea colorata) ed alla fattrice 2 (linea neutra). FC, in battiti per minuto, è la frequenza cardiaca istantanea, relativa allo spettro TDI analizzato per misurare le velocità di movimento radiale PLVS e gli intervalli di tempo in sistole ed in diastole. nd: non determinato. **Variabili TDI sistoliche:** S1 (cm/s): Velocità di contrazione isovolumetrica PLVS, Sm (cm/s): Velocità di eiezione PLVS, ET (sec): Tempo di eiezione, PEP (sec): Periodo di pre-eiezione, IVCT (sec): Tempo di contrazione isovolumetrica, PEP/ET: rapporto degli intervalli di tempo PEP/ET, IVCT/ET: rapporto degli intervalli di tempo IVCT/ET. **Variabili TDI diastoliche:** E1 (cm/s): Velocità di rilasciamento isovolumetrico PLVS, Em (cm/s): Velocità diastolica precoce PLVS, Am (cm/s): Velocità diastolica tardiva PLVS, IVRT (sec): Tempo di rilasciamento isovolumetrico. Variabili calcolate: Em/Am: rapporto delle velocità di movimento Em/Am. IPM: Indice di performance miocardica.

Sono state prese in considerazione in totale 13 variabili, di cui 7 relative alla fase sistolica e 5 a quella diastolica e l' IPM; 9/13 (69%) sono variabili misurate e 4/13 (31%) sono calcolate, come indicato nella didascalia.

Complessivamente sono state valutate 260 variabili TDI di cui è stato possibile determinarne il 72% (189/260), così distribuito: 73% (103/140) delle variabili sistoliche, 73% (73/100) delle variabili diastoliche e 60% (12/20) dell'indice funzionale derivato (IPM); 73% (132/180) delle variabili misurate e 71% (57/80) delle variabili calcolate.

L'esame TDI non è stato eseguito, per l'impossibilità di acquisire immagini e tracciati di buona qualità nei seguenti casi: intervalli di tempo 40 e 211-240 giorni di gravidanza per la fattrice 1, pre-FA e 310-320 giorni di gravidanza per la fattrice 2.

Delle 37 variabili TDI sistoliche non determinate, 26/37 (70%) sono variabili misurate, tra cui in particolare S1 e IVCT vedono il maggior numero di valori non determinati, a causa della difficoltà di identificazione dell'inizio e fine oppure della assenza dell'onda S1 nel tracciato.

Delle 27 variabili TDI diastoliche non determinate, 23/27 (85%) sono variabili misurate, tra cui in particolare E1 ed IVRT vedono il maggior numero di valori non determinati, a causa della difficoltà di identificazione dell'inizio e fine oppure della assenza dell'onda E1 nel tracciato.

L'andamento delle variabili di velocità del movimento radiale VS PL in funzione dell'età gestazionale è riportato in istogramma per la fattrice 1 (**Grafico 2.2.7**).

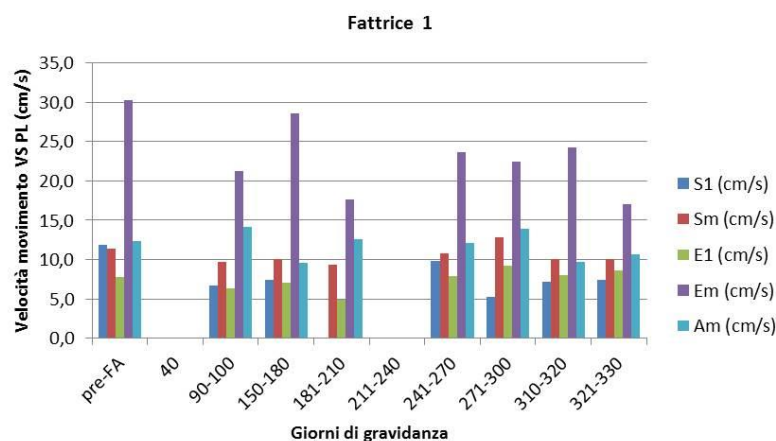


Grafico 2.2.7 Velocità del movimento sistolico e diastolico della parete libera del ventricolo sinistro (VS PL) basate sull'esame TDI in corso di gravidanza nella fattrice 1. **Velocità TDI sistoliche:** S1 (cm/s): Velocità di contrazione isovolumetrica VS PL, Sm (cm/s): Velocità di eiezione VS PL. **Velocità TDI diastoliche:** E1 (cm/s): Velocità di rilasciamento isovolumetrico VS PL, Em (cm/s): Velocità diastolica precoce VS PL, Am (cm/s): Velocità diastolica tardiva VS PL. La scala dei valori per ciascuna variabile è riportata sull'asse verticale. L'intervallo di tempo in cui è stato eseguito ciascun esame ecocardiografico nel corso della gravidanza è riportato come intervallo in giorni sull'asse orizzontale; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione.

Tra le variabili di velocità rappresentate in istogramma, solo Em mostra una diminuzione a termine della gravidanza pari a circa il 50% del suo valore rispetto a quello iniziale. Tale variazione non è altrettanto evidente nella fattrice 2.

Per quanto riguarda le variabili di tempo, sia sistoliche che diastoliche, così come l'IPM, nessun parametro sembra mostrare una variazione sostanziale nel corso della gravidanza in nessuna delle due fattrici. Questo potrebbe essere in parte riconducibile all'elevato numero di determinazioni non eseguite per tali parametri.

Con riferimento a quanto precedentemente descritto, si noti dall'istogramma come le variabili di velocità di flusso e di movimento miocardico proto-diastoliche MV E ed Em mostrino a termine della gestazione una riduzione pari a circa il 50% del loro valore iniziale (**Grafico 2.2.8**).

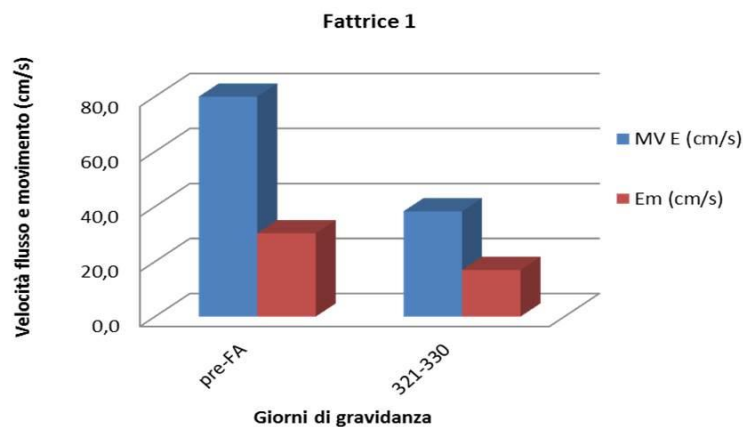


Grafico 2.2.8 Confronto tra la velocità dell'onda E del flusso trans-mitralico e dell'onda Em di movimento di parete libera del ventricolo sinistro basate sull'esame Doppler e TDI prima della gravidanza ed a termine della gravidanza nella fattrice 1. MV E (cm/s): velocità massima dell'onda E (diastolica precoce) del flusso trans-mitralico (MV), Em (cm/s): velocità massima del movimento diastolico precoce della parete libera del ventricolo sinistro. La scala dei valori per ciascuna variabile è riportata sull'asse verticale. L'intervallo di tempo degli esami ecocardiografici considerati è riportato sull'asse orizzontale; pre-FA: esame eseguito prima della fecondazione, 321-330: esame eseguito negli ultimi dieci giorni della gravidanza.

2.3 DISCUSSIONE

In questo studio ci si è proposti di valutare prospetticamente in due fattrici sane le modificazioni morfo-funzionali cardiache ed in particolare del ventricolo sinistro (VS), che avvengono nel corso della gravidanza, utilizzando tecniche ecocardiografiche convenzionali M-mode, bidimensionale (2D) e Doppler ed il recente *Tissue Doppler Imaging* (TDI).

Complessivamente è stato possibile eseguire tutti gli esami ecocardiografici previsti in entrambi i soggetti ed è stato possibile valutare la maggior parte delle variabili prese in considerazione nello studio, in particolare, la totalità dei parametri M-mode e 2D. Queste tecniche rappresentano ad oggi quelle di utilizzo routinario nella pratica ippiatrica.

Tuttavia, abbiamo riscontrato una certa variabilità nelle misurazioni eseguite tra le due fattrici. Ciò complica l'interpretazione dei dati ottenuti, volendo individuare un pattern di normalità nei parametri morfo-funzionali cardiaci in due soli soggetti. Complessivamente la fattrice 1, ha mostrato una ripetibilità maggiore nelle misurazioni rispetto alla fattrice 2, in particolare relativamente alle variabili Doppler e TDI; questo ha consentito di valutare in funzione del tempo delle variabili derivate da tutte le modalità ecocardiografiche, nel caso della fattrice 1, mentre ciò non è stato possibile per i parametri Doppler e TDI della fattrice 2.

Le modificazioni cardiache in corso di gravidanza che emergono dallo studio sono rappresentate dall'aumento della frequenza cardiaca (FC) e dell'*output* cardiaco (CO) e dall'aumento delle dimensioni dell'atrio sinistro (AS), mentre lo *stroke* volume (SV) e gli indici funzionali, frazione di accorciamento (FA) e frazione di eiezione (FE), si mantengono complessivamente costanti o mostrano un lieve *trend* in diminuzione; inoltre, nel caso della fattrice 1, è stato riscontrata la diminuzione della

velocità del picco E del flusso transmitralico, l'aumento della velocità del picco A, la diminuzione del rapporto E/A e la riduzione della velocità dell'onda Em del movimento miocardico diastolico.

Non sono state osservate variazioni significative nelle altre variabili incluse nello studio.

In entrambe le fattrici, la FC aumenta complessivamente quasi del 50% dalla valutazione prima della fecondazione (pre-FA) e dalle prime fasi della gestazione fino al termine, con un incremento più importante e più lineare a partire dall'VIII mese (211-240 giorni).

Questo è in accordo con i dati riportati in letteratura relativi all'aumento di FC in corso di gravidanza nella donna (Desai DK. et al., 2004; Estensen ME. et al., 2013) e nel cane (Blanco PG. et al., 2011; Blanco PG. et al., 2012). Nella fattrice, l'aumento della FC è stato rilevato tramite elettrocardiografia durante la gestazione avanzata (Nagel C. et al., 2011).

Nel nostro caso sono stati riscontrati valori di FC lievemente più elevati rispetto a quelli riportati nel lavoro di Nagel nell'ultimo mese di gestazione. Questo potrebbe essere spiegato come un fattore individuale delle fattrici e/o come un fattore di stress, dovuto a condizioni quali il trasporto, il cambiamento di ambiente, l'esame ecocardiografico stesso.

A tal proposito va notato che durante diversi esami in entrambe le fattrici, sono stati osservati anche dei picchi nella FC, imputabili a situazioni momentanee di eccitamento o stress, che hanno reso difficile l'interpretazione dei dati delle variabili ecocardiografiche misurate durante queste fasi. Questi eventi sono man mano cessati dalla II metà della gravidanza, probabilmente in ragione dell'adattamento dell'animale alle manualità. Va tuttavia ricordato, che Nagel et al. suggeriscono nella fattrice una riduzione dell'attività simpatica in prossimità del parto e necessaria ai fini dello stesso (Nagel C. et al., 2011).

L'aumento del CO si realizza nel corso della gravidanza in entrambe le fattrici ed in maniera più importante a partire dall' VIII mese, con un andamento sostanzialmente concorde con quello della FC.

L'aumento del CO è un dato in accordo con quanto riportato in letteratura per il cane (Blanco PG. et al., 2011; Blanco PG. et al., 2012) e per la donna. Relativamente alla donna, viene generalmente riportato un incremento del CO che avviene in modo consistente nel I e II trimestre, mentre i dati sono discordanti per quanto riguarda l'ultimo trimestre di gravidanza (Desai DK. et al., 2004; Mabie WC. et al., 1994; van Oppen AC. et al., 1996).

Durante la gravidanza, insieme all'aumento del CO, avverrebbe un aumento nel volume ematico ed una redistribuzione del flusso ematico dagli altri organi verso l'utero gravido (Ousey JC. et al., 2012).

Nella fattrice, durante la gravidanza avanzata (dai 210 giorni a termine) si ha un aumento del volume di flusso ematico uterino di circa 3 volte, che accompagna un aumento di circa 3-4 volte nella massa del feto nello stesso periodo. La relazione tra aumento del flusso ematico uterino e peso del feto è stata dimostrata anche nella donna, nella bovina e nella pecora (Ousey JC. et al., 2012)..

Nella donna inoltre, anche il CO è stato positivamente correlato al peso del feto alla nascita (Desai K. et al., 2004; Mabie WC. et al., 1994). Analogamente, l'importante aumento del CO riscontrato in questo studio dall'VIII mese potrebbe essere correlato con la fase di rapida crescita fetale.

Nella donna, Desai et al., hanno evidenziato un'ampia variabilità nella misurazione del CO durante il III trimestre, imputandola principalmente a dei fattori individuali piuttosto che a degli errori di misurazione, ma considerando che la differenza nei protocolli e nella tecniche di misurazione

tra i diversi studi può almeno in parte spiegare le differenze riportate (Desai K. et al., 2004).

Per quanto riguarda il calcolo del CO nel nostro studio, si osserva un'ampia variabilità nei risultati ottenuti dai vari metodi di misurazione. Il metodo che ha fornito le misurazioni più ripetibili e quindi ha permesso di individuare un *trend* in funzione del tempo in maniera più affidabile è quello bidimensionale, con l'applicazione del metodo di Simpson.

In accordo con la letteratura, questo metodo, nonostante alcuni limiti tecnico-analitici, sembra essere più accurato di altri, quale l'M-mode, al fine di ottenere delle stime volumetriche del VS dalla scansione in asse lungo e quello maggiormente utile per rilevare variazioni nel CO (McConachie E. et al., 2013; Schefer KD. et al., 2010).

La determinazione dello SV e del CO tramite Doppler è considerata poco affidabile nel cavallo. Gran parte della variabilità nelle misure è associata alla misurazione del diametro aortico (McConachie E. et al., 2013; Desai DK. et al., 2004); nel nostro caso inoltre, non è stato possibile eseguire accuratamente diverse misurazioni dell'integrale velocità-tempo del flusso aortico a causa della qualità inadeguata dello spettro Doppler. La rilevazione Doppler del flusso aortico richiede infatti condizioni ottimali per l'allineamento al flusso, spesso non consentite dalla morfologia toracica e dai movimenti delle fattrici.

Analoghe considerazioni sull'affidabilità del metodo si possono fare relativamente al calcolo dello SV, da cui il CO è derivato e degli indici di funzionalità del VS, quali la FA e la FE.

La FE, calcolata in 2D, è considerata più accurata e meno influenzata dall'alterata geometria della camera rispetto agli indici lineari, ovvero la FA calcolata tramite M-mode, anche se quest'ultima rappresenta praticamente

l'unico indice utilizzato nelle valutazioni di routine nel cavallo (Schefer KD. et al., 2010).

Nel nostro studio, lo SV accompagnato dalla FE e, seppur con maggior variabilità dalla FA, nella II metà della gravidanza mostra un andamento complessivamente in lieve diminuzione nella fattrice 1 e circa costante rispetto all'inizio nella fattrice 2.

L'andamento dello SV riflette la modificazione relativa del volume diastolico finale (VDF) rispetto al volume sistolico finale (VSF). Nella II metà della gravidanza, il VDF presenta un andamento in crescita o viene quantomeno mantenuto a livello dei valori iniziali in entrambe le fattrici; il VSF va incontro ad un aumento nella fattrice 1, mentre rimane circa costante o aumenta in maniera non importante nella fattrice 2. Ciò rende ragione della differenza nell'andamento dello SV e della FE tra i due soggetti.

Nel cane (Blanco PG. et al., 2011; Blanco PG. et al., 2012) viene riportato un aumento dello SV e degli indici di funzionalità VS nel corso della gestazione.

La letteratura in campo umano riporta risultati contraddittori relativi alla funzione sistolica del VS, che rendono ragione almeno in parte anche delle differenze nei dati sul CO, in particolare nel corso dell'ultimo trimestre (Desai DK. et al., 2004).

Nella donna, Estensen ME. et al., in accordo con altri studi, hanno riscontrato che dopo un iniziale transitorio aumento della funzionalità, si ha una riduzione nella funzionalità sistolica con l'avanzare della gestazione, rappresentata dalla diminuzione della FE e delle velocità sistoliche del movimento miocardico (Estensen ME. et al., 2013). Diversi altri studi hanno invece dimostrato che la funzione sistolica, espressa come FE o come FA,

viene quantomeno mantenuta nel corso della gravidanza (Desai DK. et al., 2004; Mabie WC. et al., 1994).

Non è possibile affermare con certezza se anche nel nostro caso si verifichi un'iniziale fase di mantenimento o lieve incremento della funzionalità cardiaca; questa sarebbe seguita da una riduzione significativa della funzionalità stessa tra il VI ed il VII mese che precede l'andamento già discusso negli ultimi mesi di gravidanza.

La maggior parte dei dati riportati non tiene in considerazione l'influenza delle condizioni di carico sui parametri funzionali del VS. Infatti una delle limitazioni della FA, come della FE, è che questi indici, in tutte le specie, sono sensibili e dipendenti dalle condizioni di carico ed in particolare dal precarico.

In quest'ottica è utile valutare la contrattilità sistolica tramite variabili meno dipendenti dal carico, quali la velocità di accorciamento circonferenziale e lo stress sistolico di parete VS, come fatto nella donna (Estensen ME. et al., 2013; Poppas A. et al., 1997) e nel cane (Blanco PG. et al., 2011). Estensen et al. hanno dimostrato nella donna che, a fronte di una diminuzione del post-carico durante la gravidanza, alla riduzione della funzione sistolica VS si accompagna la riduzione della contrattilità VS (Estensen ME. et al., 2013). Tuttavia, queste variabili non sono state valutate nell'ambito di questo studio.

Uno dei fattori che può influenzare maggiormente la funzionalità sistolica e diastolica VS è la diminuzione del post-carico, di cui la caduta della pressione arteriosa sistemica e l'aumento del flusso uterino possono rappresentare una misura indiretta. Molti Autori sottolineano infatti la relazione tra l'aumento dello SV, quindi del CO e la riduzione dell'indice di resistenza (IR) a livello di arterie uterine, che sarebbe associato ad una

diminuzione del VSF (Blanco PG. et al., 2011; Blanco PG. et al., 2012; Valensise H. et al., 2000).

Per quanto riguarda i soggetti inclusi nel nostro studio, analogamente a quanto riportato in letteratura (Bollwein H. et al., 2003; Bollwein H. et al., 2004; Ousey JC. et al., 2012), è stata riscontrata una diminuzione dell'IR nel corso della gravidanza in entrambe le fattrici e tale riduzione dell'IR si realizza in maniera importante nella I metà della gestazione, per poi non subire sostanziali modificazioni fino al termine (per questi dati si rimanda ai Risultati e Discussione del Progetto 1).

Nel nostro studio abbiamo riscontrato un significativo aumento delle dimensioni dell'AS dall'inizio al termine della gravidanza in entrambe le fattrici. Tale modificazione risulta confermata in tutte le modalità di misurazione, a fronte di una certa variabilità osservabile intra- ed inter-metodica ed è in accordo con quanto riportato in medicina umana (Desai KD. et al., 2004; Estensen ME. et al., 2013; Valensise H. et al., 2000).

L'ingrandimento dell'AS potrebbe risultare da un aumento nel precarico e nel volume circolante, mentre un ingrandimento dell'AS e del VS sarebbe spiegato da un aumento nel solo precarico (Valensise H. et al., 2004). Nel nostro caso, non avendo riscontrato un aumento nelle dimensioni VS, si potrebbe supporre che sia un aumento nel precarico sia un aumento del volume circolante siano implicati.

Fisiologicamente, ad un aumento del precarico ed una diminuzione del postcarico sarebbe associato un aumento della funzione sistolica VS (Desai DK. Et al., 2004). Alla luce di questo, tante differenze nei dati presenti in letteratura, così come nel caso dei nostri soggetti sono difficili da spiegare.

Anche relativamente alla funzione diastolica del VS la bibliografia medica umana riporta dati discordanti (Estensen ME. et al., 2013).

In questo lavoro è stato riscontrato un calo della velocità del picco E dell'onda transmitralica in gravidanza avanzata nella fattrice 1, accompagnato dal progressivo aumento del picco A e la conseguente riduzione del rapporto E/A, che diviene inferiore a 1 a termine. Per quanto riguarda la fattrice 2, come anticipato, la scarsità e la variabilità dei dati ottenuti non ha consentito di riconoscere un trend per queste variabili, anche se A sembrerebbe aumentare nella II metà della gestazione.

Nella donna, alcuni Autori riportano un aumento del picco A ed una riduzione di E/A in corso di gravidanza (Mesa A et al. 1999; Valensise H. et al., 2013), mentre altri riportano solo una diminuzione di E, responsabile della riduzione di E/A, con A invariato (Estensen ME. et al., 2013).

Nel nostro caso, il quadro suggerirebbe lo sviluppo di una condizione da alterato rilasciamento del VS in gestazione avanzata e ciò sarebbe ulteriormente supportato dalla diminuzione della velocità E_m del movimento miocardico diastolico verso la fine della gravidanza rispetto all'inizio. Estensen et al. hanno rilevato analoghe modificazioni e suggeriscono che ciò potrebbe rappresentare un reale cambiamento nella funzione diastolica o risultare da una modificazione nelle condizioni di carico (Estensen ME. et al., 2013).

Per quanto riguarda le variabili TDI, ad eccezione di E_m nella fattrice 1, nessun'altra ha mostrato variazioni significative nel corso della gravidanza. Tuttavia, solo le onde S_m ed E_m erano costantemente identificabili negli spettri TDI acquisiti, mentre la difficoltà di riconoscere le onde in diversi casi ha precluso la possibilità di misurare $S_1, E_1, IVRT$ e quindi l'IMP. Il numero ridotto di misurazioni può rendere in parte ragione della difficoltà nel rilevare cambiamenti significativi nella variabili, in particolare per quanto riguarda la fattrice 2.

Lo studio presenta dei limiti considerevoli. Innanzitutto l'inclusione di due soli soggetti, che non permette di fare alcun tipo di analisi statistica ed inoltre, in ragione dei dati non concordi tra le due fattrici, rende difficile l'interpretazione di alcuni parametri. Tuttavia, bisogna considerare le notevoli difficoltà e l'impegno di risorse necessario per trasportare, stabulare e gestire una fattrice da sottoporre ad esami seriali nel corso di una gravidanza di durata pari a circa 330 giorni; inoltre la non trascurabile entità del protocollo ecografico eseguito a ciascun intervallo di tempo, comprendente oltre alla valutazione ecocardiografica, la valutazione della perfusione utero-placentare. Questi fattori hanno imposto una radicale limitazione al numero di soggetti inclusi. Bisogna infine tenere conto della destinazione e della gestione di un numero più elevato di puledri neonati, in quanto le fattrici sono state fecondate ai fini del presente studio.

Un secondo importante limite è rappresentato dall'impossibilità di ottenere la misurazione di tutte le variabili in entrambi i soggetti e quindi dalla perdita della possibilità di confronto di parametri interessanti tra le due fattrici, come per esempio la riduzione delle onde MV E ed Em.

A questo è legato un altro limite dello studio, dovuto alla notevole influenza di fattori di stress o eccitamento individuali sulla possibilità di acquisizione di immagini e scansioni di buona qualità, già normalmente limitata dal punto di vista anatomico nel cavallo e sull'analisi ed interpretazione delle misurazioni ottenute.

A tal proposito va ricordato che molti parametri di funzionalità del VS sono altamente dipendenti dalla FC, per cui la FC istantanea va tenuta in considerazione quando si valutano misurazioni quantitative di parametri ecocardiografici in singoli soggetti.

In conclusione, in questo studio sono state osservate delle modificazioni emodinamiche in corso di gravidanza fisiologica, relative

all'aumento della FC, del CO ed in particolare all'aumento del precarico ed alle onde di riempimento del VS, in accordo con quanto già osservato nella donna.

Sulla base dei nostri dati non è possibile stabilire quale sia il pattern di adattamento che avviene nel corso della gravidanza e come i vari parametri interagiscono fra loro.

Quanto si potrebbe affermare è che l'atteso aumento del CO è accompagnato dall'aumento della FC e forse da questo sostenuto in maniera preponderante, almeno nella II metà della gravidanza, rispetto a quanto avverrebbe nelle altre specie. Anche se i dati in medicina umana non sono univoci, Desai et al. riportano che nella donna il CO sarebbe sostenuto dall'aumento della FC nella prima parte della gravidanza e principalmente dall'incremento dello SV nella II metà (Desai KD. et al., 2004).

Non si può escludere che la cavalla, in quanto animale erbivoro e caratterizzato da una predominante vagotonia, possa attuare un adattamento morfo-funzionale cardiaco al carico di lavoro indotto dallo stato gravidico differente dalle altre specie studiate e sostanzialmente basato sull'aumento della FC. Già Nagel et al., in base a quanto osservato nell'ultimo mese di gravidanza, hanno suggerito che il sistema cardiovascolare della fattrice si adatti alle crescenti esigenze metaboliche della gestazione attraverso un aumento della FC (Nagel C. et al., 2011).

Questo studio preliminare potrebbe costituire una base per svolgere future indagini su una popolazione di studio più ampia ed aumentare il numero di dati disponibili al fine di individuare un pattern normale di adattamento morfo-funzionale cardiaco e di stabilire quali parametri possano essere clinicamente utili per il riconoscimento e la diagnosi delle gravidanze a rischio nella fattrice.

TAVOLA I DELLE FIGURE

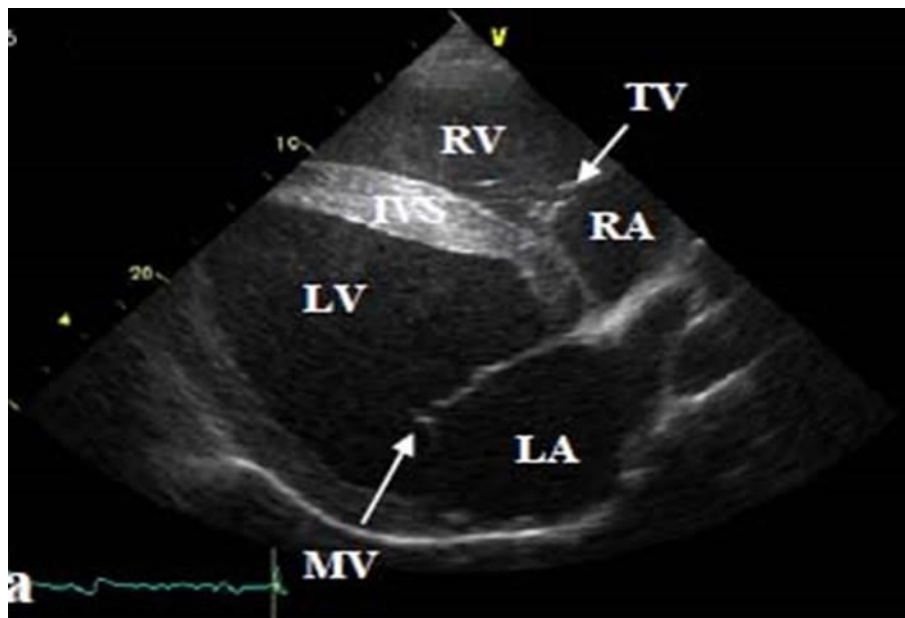


Figura 1.2.1. Immagine 4-camere del cuore in scansione parasternale destra asse lungo. LV: ventricolo sinistro; LA: atrio sinistro; RV: ventricolo destro; RA: atrio destro; IVS: setto interventricolare; MV: valvola mitrale; TV: valvola tricuspide.

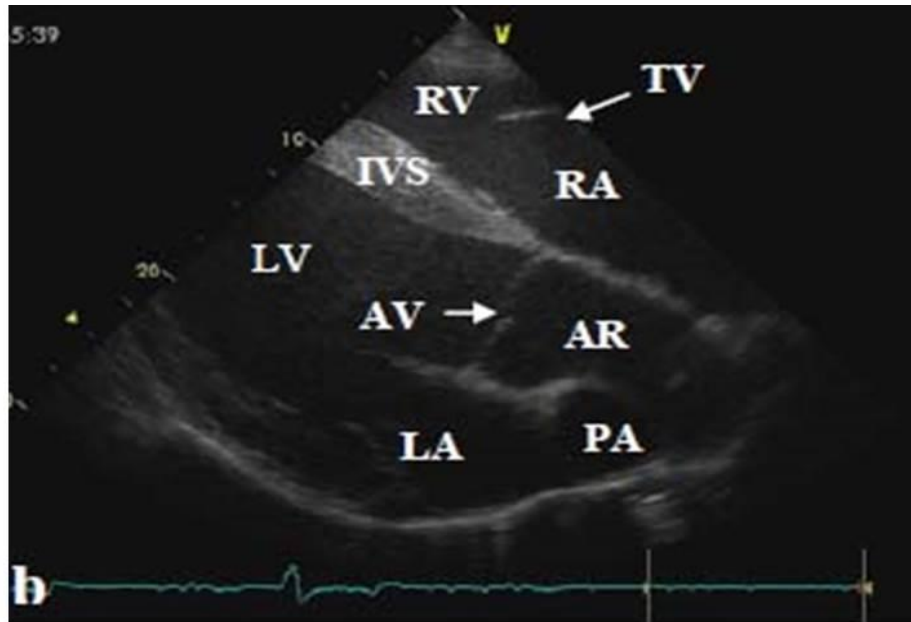


Figura 1.2.2 Immagine del tratto di efflusso del ventricolo sinistro (5 camere) in scansione parasternale destra asse lungo. LV: ventricolo sinistro; LA: atrio sinistro; RV: ventricolo destro; RA: atrio destro; IVS: setto interventricolare; MV: valvola mitrale; TV: valvola tricuspide; AV: valvola aortica; AR: PA: arteria polmonare.

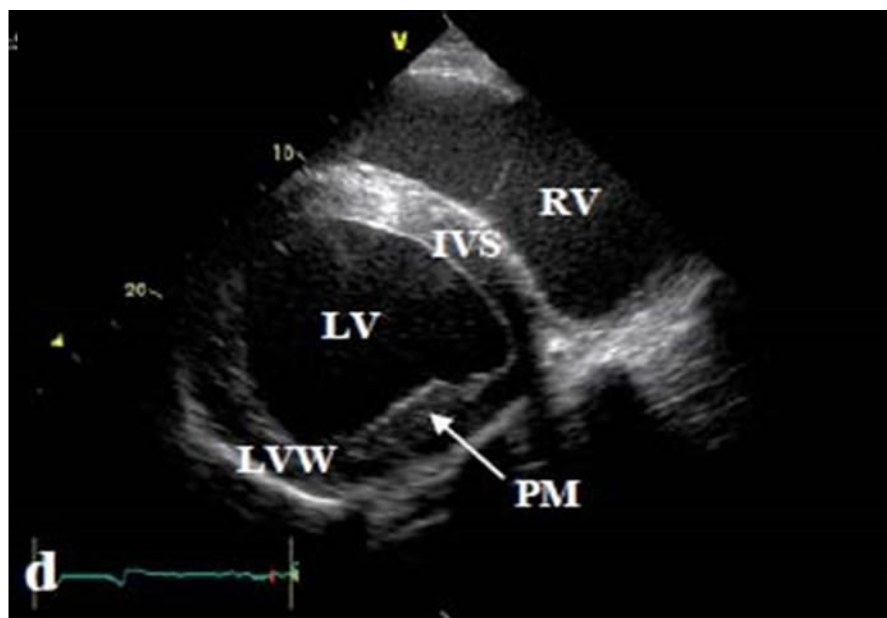


Figura 1.2.3. Immagine del ventricolo sinistro a livello dei muscoli papillari in scansione parasternale destra asse corto. LV: ventricolo sinistro; IVS: setto interventricolare; RV: ventricolo destro; LVW: parete ventricolo sinistro; PM: muscolo papillare.

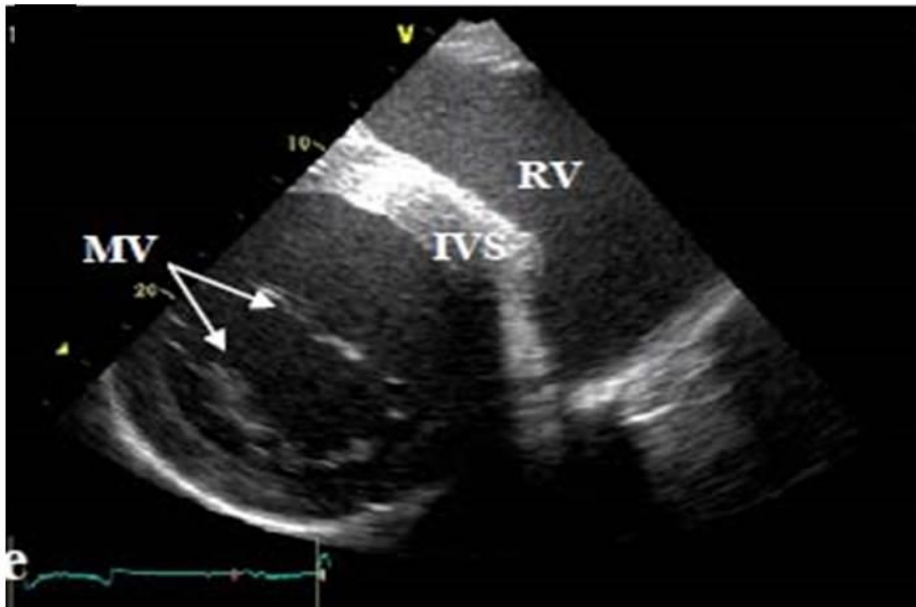


Figura 1.2.4. Immagine della valvola mitrale in scansione parasternale destra asse corto. MV: valvola mitrale; IVS: setto interventricolare; RV: ventricolo destro.

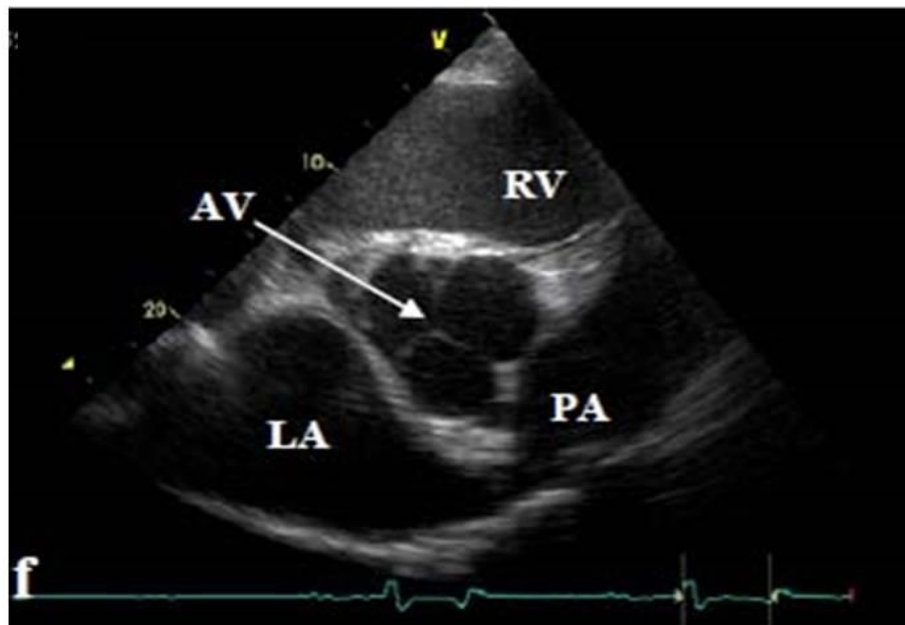


Figura 1.2.5. Immagine della valvola aortica e dell'atrio sinistro in scansione parasternale destra asse corto. AV: valvole aortica; LA: atrio sinistro; RV: ventricolo destro; PA: arteria polmonare.

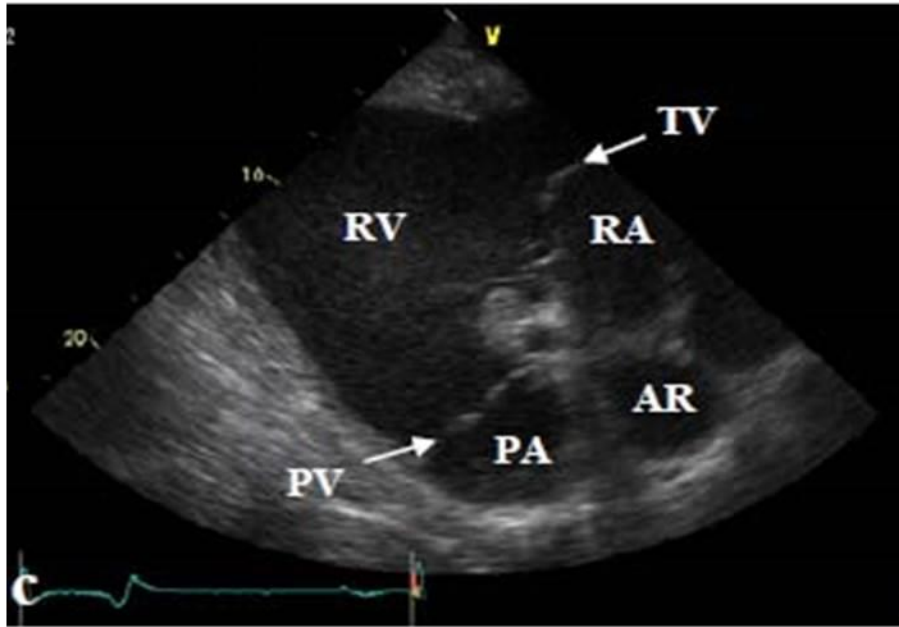


Figura 1.2.6. Immagine del tratto di afflusso e di efflusso del ventricolo destro in scansione parasternale destra asse corto obliquo. RV: ventricolo destro; TV: valvola tricuspide; RA: atrio destro; PV: valvola polmonare; PA:arteria polmonare; AR: radice aortica.

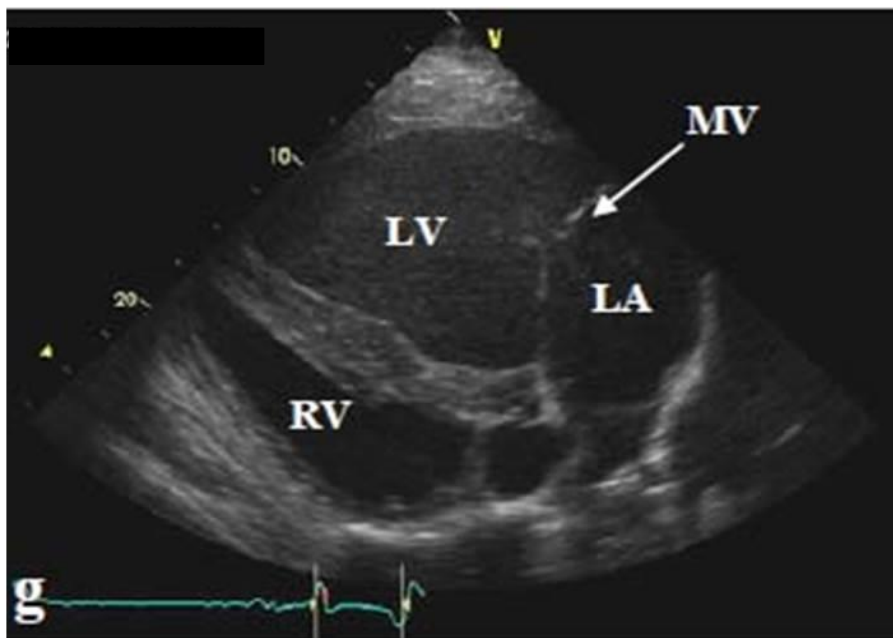


Figura 1.2.7. Immagine del tratto di afflusso ventricolare sinistro in scansione parasternale sinistra asse lungo (4 camere). LV: ventricolo sinistro; MV: valvola mitrale; LA: atrio sinistro; RV: ventricolo destro.

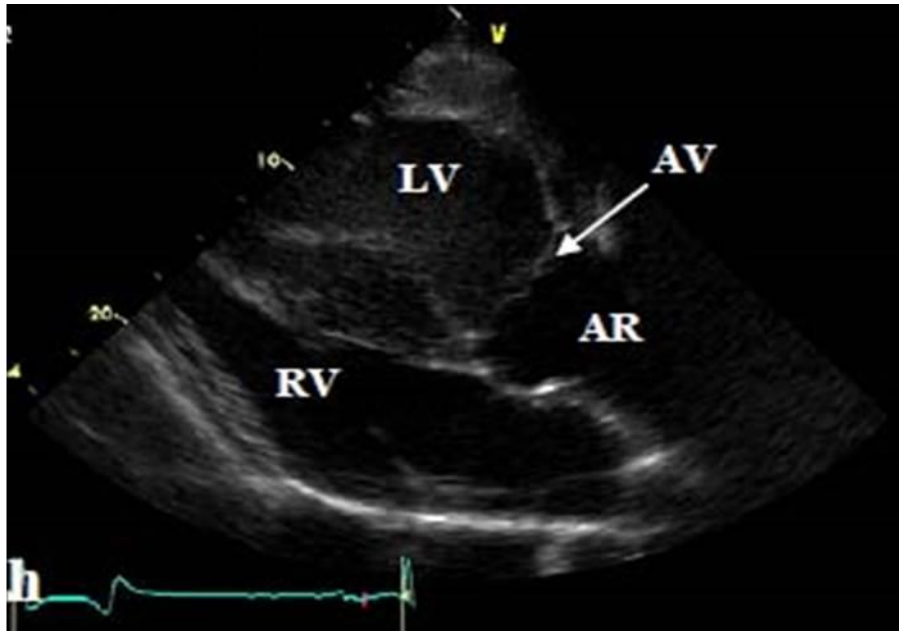


Figura 1.2.8. Immagine del tratto di efflusso del ventricolo sinistro in scansione parasternale sinistra asse lungo. AV: valvola aortica; LV: ventricolo sinistro; RV: ventricolo destro; AR: radice aortica.

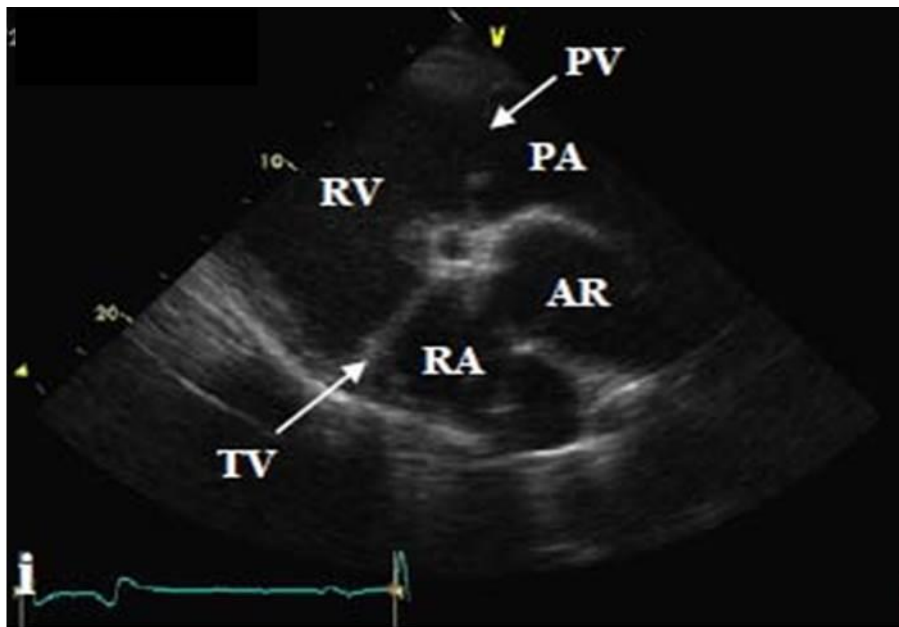


Figura 1.2.9. Immagine del tratto di efflusso del ventricolo destro dalla scansione parasternale sinistra asse lungo obliquo. PV: valvola polmonare; PA: arteria polmonare; RV: ventricolo destro; TV: valvola tricuspide; RA: atrio destro; AR: radice aortica.

TAVOLA II DELLE FIGURE

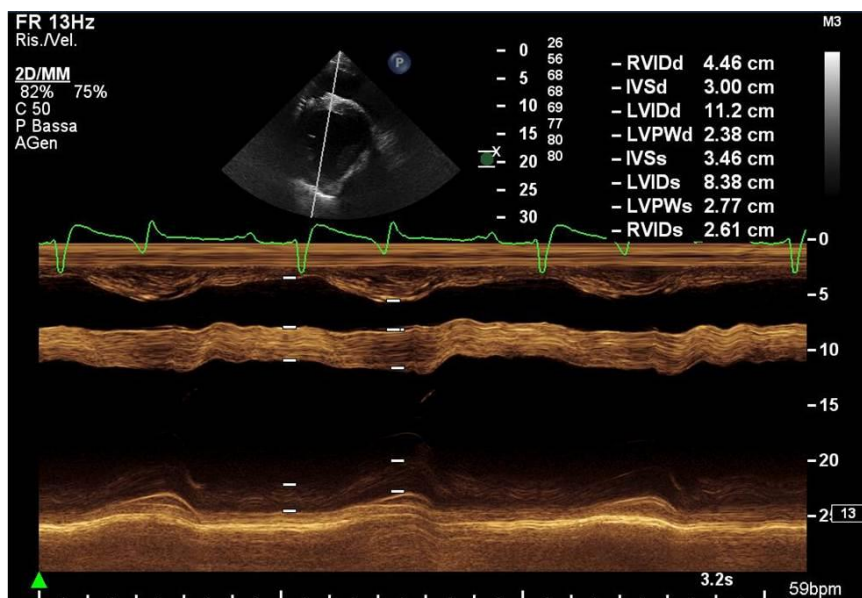


Figura 2.1.1 Misurazioni lineari delle variabili M-mode del ventricolo sinistro. In alto, è visualizzata l'immagine 2D in asse corto, cui è sovrapposta la linea cursore, in basso, tracciato del movimento in funzione del tempo. Si noti sul tracciato il posizionamento del calibro elettronico per misurare lo spessore delle pareti e delle camere, **IVSs**: spessore della parete libera del ventricolo sinistro in sistole, **LVIDs**: diametro interno del ventricolo sinistro in sistole, **LVPWs**: spessore della parete libera del ventricolo sinistro in diastole, **IVSd**: spessore del setto interventricolare in diastole, **LVIDd**: diametro interno del ventricolo sinistro in diastole, **LVPWd**: spessore della parete libera del ventricolo sinistro in diastole, **RVIDd**: diametro interno del ventricolo destro in diastole, **RVIDs**: diametro interno del ventricolo destro in sistole.

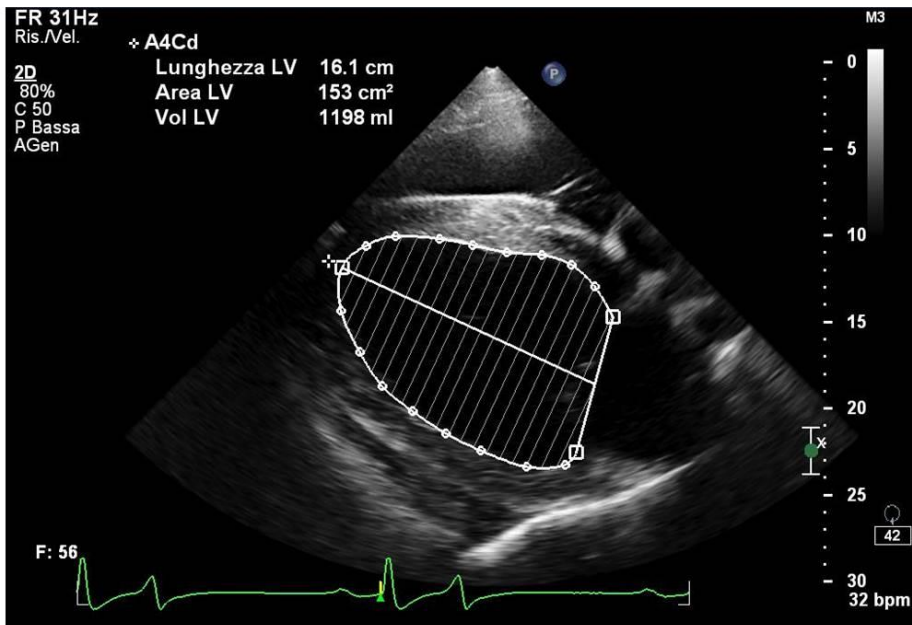


Figura 2.1.2. Calcolo del volume (Vol) del ventricolo sinistro in tele-diastole con il metodo di Simpson modificato, ottenuto tracciando manualmente area e lunghezza della camera dalla scansione parasternale destra asse lungo. LV: ventricolo sinistro.

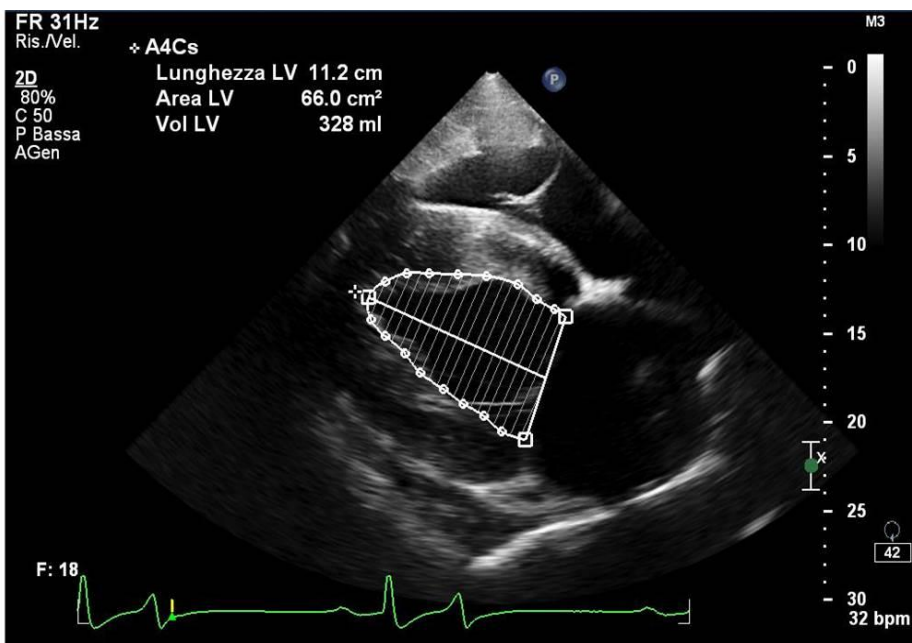


Figura 2.1.3. Calcolo del volume del ventricolo sinistro in tele-sistole con il metodo di Simpson modificato, ottenuto tracciando manualmente area e lunghezza della camera dalla scansione parasternale destra asse lungo. LV: ventricolo sinistro.

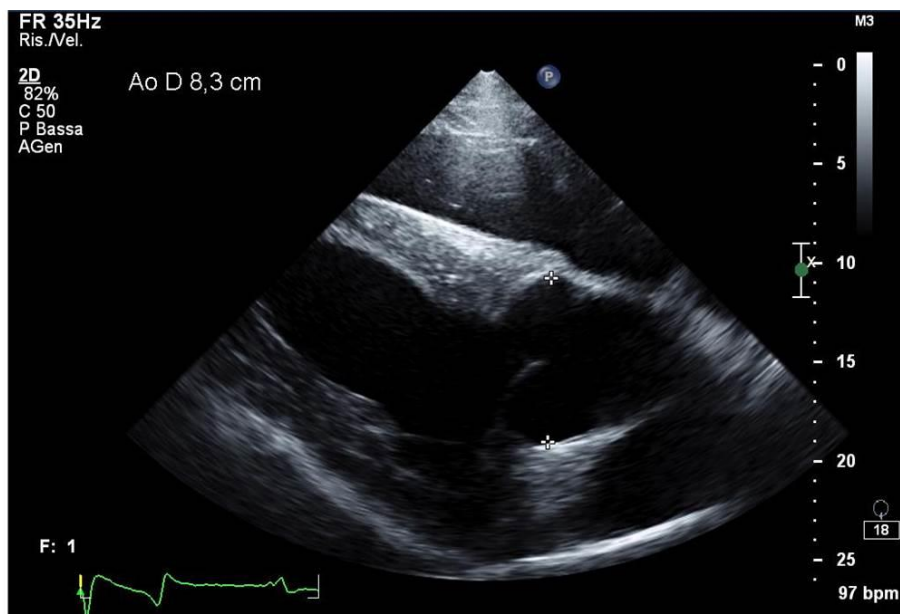


Figura 2.1.4. Misurazione del diametro dell'aorta a livello del seno di Valsava ottenuta tracciando manualmente la misura dalla scansione parasternale destra asse lungo a 5 camere. Ao D: diametro aortico.

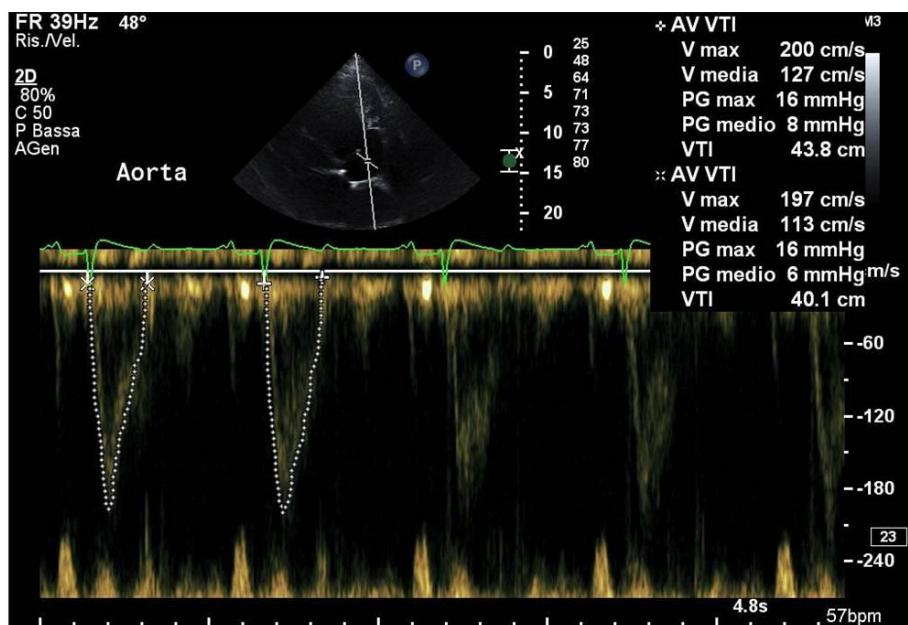


Figura 2.1.5. Calcolo dell'integrale velocità-tempo del flusso aortico (AV VTI), ottenuto tracciando manualmente il profilo dell'onda sullo spettro Doppler pulsato. Oltre al VTI, il software fornisce la velocità massima (Vmax) ed altri parametri di velocità e pressione non considerati nelle analisi.

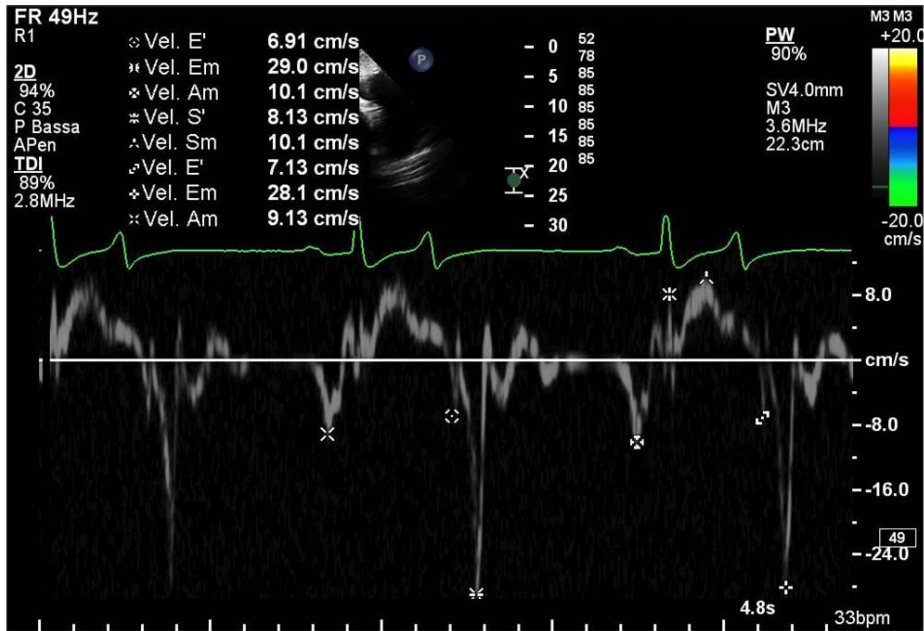


Figura 2.1.6. Misurazione delle velocità di picco del movimento radiale della parete libera del ventricolo sinistro sullo spettro TDI pulsato, ottenuta tracciando manualmente l'altezza dei picchi. S':picco di velocità durante la contrazione isovolumetrica, Sm: picco di velocità durante l'eiezione, E': picco di velocità durante il rilassamento isovolumetrico, Em: picco di velocità durante la diastole precoce, Am: picco di velocità durante la diastole tardiva.

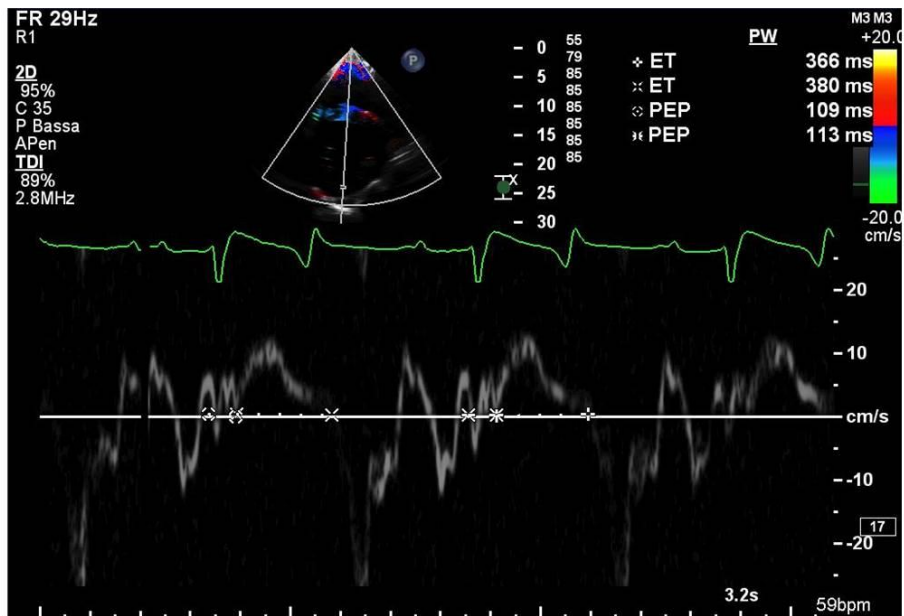


Figura 2.1.7. Misurazione di alcuni intervalli di tempo sistolici sullo spettro TDI pulsato del movimento di parete libera del ventricolo sinistro, ottenuta tracciando manualmente la misura sull'asse temporale. La misurazione è stata eseguita su due cicli cardiaci. ET: tempo di eiezione, PEP: tempo di pre-eiezione. L'IVCT (tempo di contrazione isovolumetrica) non è indicato in questa immagine.

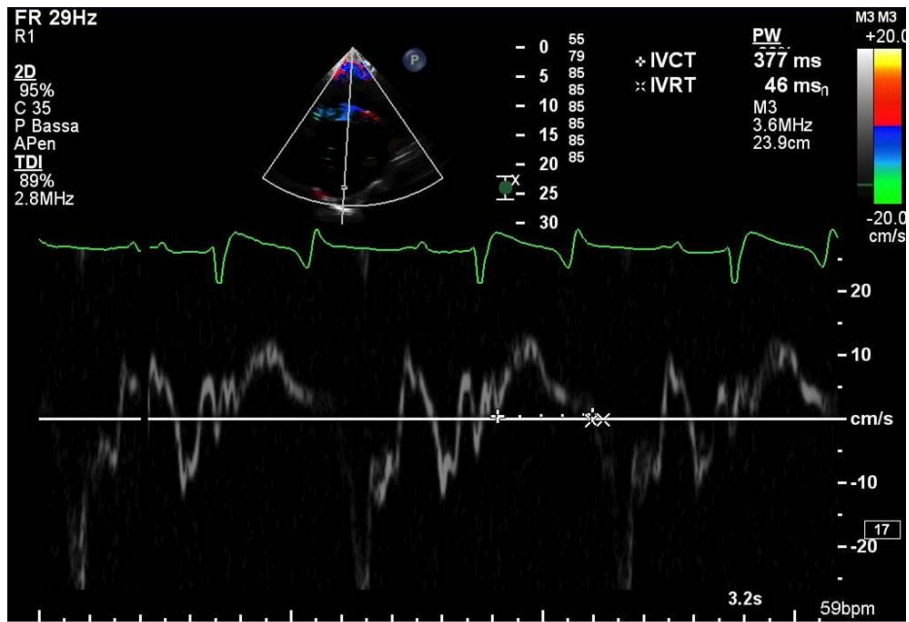


Figura 2.1.8. Misurazione dell' intervallo di tempo sistolico IVCT e diastolico IVRT sullo spettro TDI pulsato del movimento di parete libera del ventricolo sinistro, ottenuta tracciando manualmente la misura sull'asse temporale. IVCT: tempo di contrazione isovolumetrica, IVRT: tempo di rilassamento isovolumetrico.

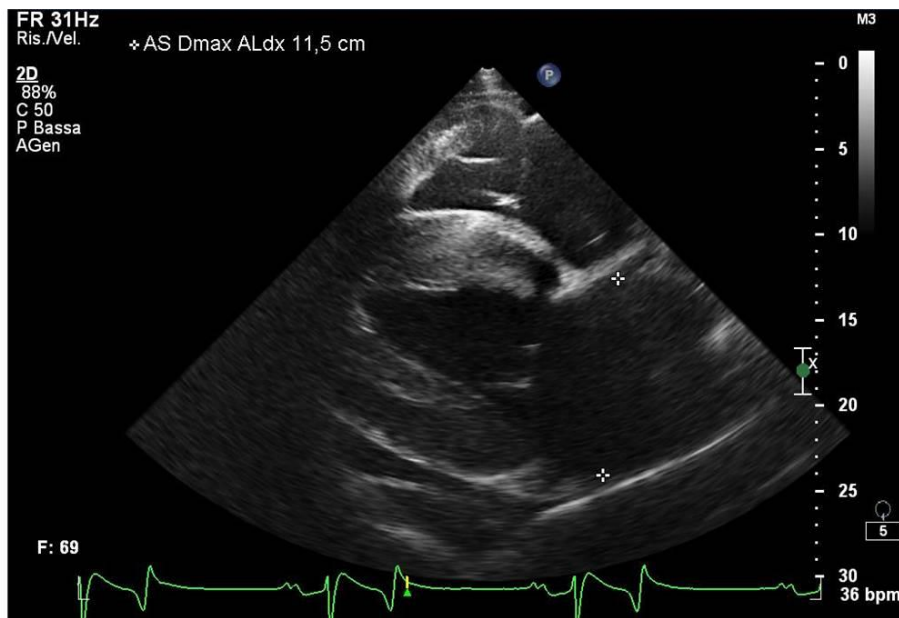


Figura 2.1.9. Misurazione del diametro massimo dell'atrio sinistro (AS) ottenuta tracciando manualmente la distanza dalla scansione parasternale destra asse lungo (ALdx).

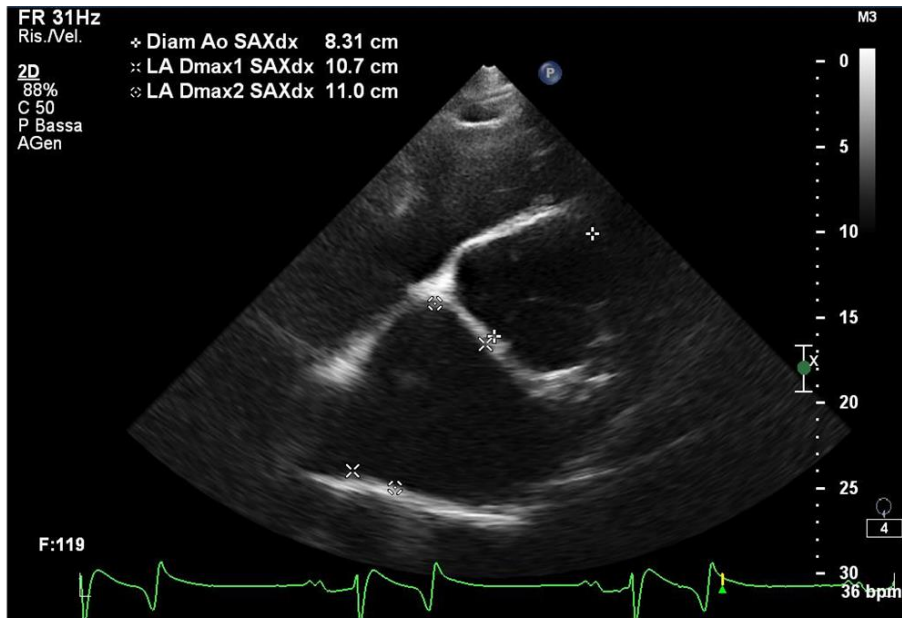


Figura 2.1.10. Misurazione dei diametri (Dmax1 e Dmax2) dell' atrio sinistro (LA) e della radice aortica (Diam. Ao) ottenuta tracciando manualmente la distanza dalla scansione parasternale destra asse corto (SAXdx).

BIBLIOGRAFIA

Abd-Elnaeim M., Leiser R., Wilsher S., Allen W.R.
Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta* 2006, **27**: 1103–1113.

Bakos Z., Voros K., Jarvinen T., Reiczigel J.
Two-dimensional and M-mode echocardiographic measurements of cardiac dimensions in healthy standardbred trotters. *Acta Veterinaria Hungarica* 2002, **50**(3): 273-282.

Bamfo JEAK., Kametas NA., Nicolaidis KH., Chambers JB.
Maternal left ventricular diastolic and systolic function during normal pregnancy. *European Journal of Echocardiography* 2007, **8**: 360-368.

Betros CL., McKeever KH., Kearns CF., Malinowski K.
Effects of ageing and training on maximal heart rate VO_2 max. *Equine Veterinary Journal* 2002, Suppl. **34**: 100-105.

Blanco PG., Arias DO., Gobello C.
Doppler ultrasound in canine pregnancy. *Journal of Ultrasound in Medicine* 2008, **27**: 1745-175.

Blanco PG., Tortora M., Rodriguez R., Arias DO., Gobello C.
Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *The Veterinary Journal* 2011, **190**: 154-159.

Blanco PG., Batista PR., Gomez FE., Arias DO., Gobello C.
Echocardiographic and Doppler assessment of maternal cardiovascular function in normal and abnormal canine pregnancies. *Theriogenology* 2012, **78**: 1235-1242.

Blissit KJ., Bonagura JD.
Pulsed wave Doppler echocardiography in normal horses. *Equine Veterinary Journal* 1995, **19**(Suppl): 38-46.

Blissit KJ., Young LE., Jones RS., Darke PGG., Utting J.
Measurement of cardiac output in standing horses by Doppler echocardiography and thermodilution. *Equine Veterinary Journal* 1997, **29** (1): 18-25.

Bonagura JD., Blissit KJ.
Echocardiography. *Equine Veterinary Journal* 1995, **19**(Suppl): 5-17.

Boon JA.
Evaluation of size, function, and hemodynamics. In: Boon JA., *Manual of Veterinary Echocardiography*, Baltimore, Williams & Wilkins; 1998: 151-260.

Caso P., D'Andrea A., Di Salvo G., Severino S., Santoro G., Calabrò R.
Doppler Myocardial Imaging. In: Calabrò R., Caso P., Pacileo G., Severino S., *Nuove Tecniche Ecocardiografiche: dalla Metodologia alla Clinica*, Edizioni Piccin, 2005: 13-66.

Cornette J. and Roos-Hesselink JW.
Normal cardiovascular adaptation to pregnancy. In: Stergiopoulos K., Brown DL. (Eds). *Evidence-based Cardiology Consult. DOI 10.1007978-1-4471-029*, Springer-Verlag London, 2014: 423-441.

Decloedt A., Verheyen T., Sys S., De Clercq D., van Loon G.
Evaluation of tissue Doppler imaging for regional quantification of radial left ventricular wall motion in healthy horses. *American Journal of Veterinary Research* 2013, **74**: 53-61.

Desai DK., Moodley J., Naidoo DP.
Echocardiographic assessment of cardiovascular haemodynamics in normal pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 2004, **104**: 20-29.

Eghbali M., Deva R., Alioua A., Minosan TY, Ruan H., Wang Y., Toro L., Stefani E.
Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circulation Research* 2005, **96**: 1208-1216.

Fowden AL., Forhead AJ., White KL., Taylor PM.
Equine utero-placental metabolism at mid and late gestation. *Experimental Physiology* 2000, **85**: 539-545.

Estensen ME., Beitnes JO., Grindheim G., Aaberge L., Smiseth OA., Henriksens T., Aakhus S.

Altered maternal left ventricular contractility and function during normal pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2013, **41**: 659-666.

Giguere S., Bucki E., Adin DB., Valverde A., Estrada AH., Young L.

Cardiac output measurement by partial carbon dioxide rebreathing, 2-dimensional echocardiography, and lithium-dilution method in anesthetized neonatal foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2005, **19**: 737-743.

Giles RC., Donahue JM., Hong CB., Tuttle PA., Petrites-Murphy MB., Poonacha KB., Roberts AW., Tramontin RR., Smith B., Swerczek TW.

Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3527 cases (1986-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1993, **203**: 1170-1175.

Grenacher PA., Schwarzwald CC.

Assessment of left ventricular size and function in horses using anatomical M-mode echocardiography. *Journal of Veterinary Cardiology* 2010, **12**: 111-121.

Hoffmann KL.

Echocardiography. In: Rantanen NW., Mc Kinnon AO., *Equine Diagnostic Ultrasound*, Baltimore; William & Wilkins, 1998: 19-39.

Kametas NA., McAuliffe F., Hancock J., Chambers J., Nicolaidis KH.

Maternal left ventricular mass and diastolic function during pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2001, **18**: 460-466.

Lang RM., Bierig M., Devereux RB., Flachskampf FA., Foster E., Pellikka PA., Picard MH., Roman MJ., Seward J., Shanewise J., Solomon S., Spencer KT., St John Sutton M., Stewart W.

Recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *Journal of American Society of Echocardiography* 2005, **18**: 1440-1463.

LeBlanc MM.

Induction of parturition. In: McKinnon AO., Voss JL. *Equine Reproduction*, Philadelphia, Lea&Febiger, 1993:574-577.

Long KJ., Bonagura JD., Darke PGG.

Standardized imaging technique for guided M-mode and Doppler echocardiography in the horse. *Equine Veterinary Journal* 1992, **24**: 226-235.

Mabie WC., DiSessa TG., Crocker LG., Sibai BM., Arheart KL.

A longitudinal study of cardiac output in normal human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1994, **170**: 849-856.

Marr CM., Patteson M.

Echocardiography. In: Marr CM., Bowen M. *Cardiology of the horse*, 2 Ed., Elsevier Saunders, 2010: 105-126.

Mesa A., Jessurun C., Hernandez A., Adam K., Brown D., Vaughn WK., Wilansky S.

Left ventricular diastolic function in normal human pregnancy. *Circulation* 1999, **2**: 511-517.

Santschi E., Vaala WE.

Identification of the High-Risk Pregnancy. In: McKinnon AO., Squires EL., Vaala WE., Varner DD., *Equine Reproduction*, 2^o Ed., Chichester, Wiley-Blackwell; 2011: 5-15.

McConachie E., Barton MH., Rapoport G., Giguère S.

Doppler and volumetric echocardiographic methods for cardiac output measurement in standing adult horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013, **27**: 324-330.

Otto CM.

Left and right ventricular systolic function. In: Otto CM., *Textbook of Clinical Echocardiography*, 3^o ed., Philadelphia, Elsevier Saunders; 2004: 131-165.

Ousey JC., Kolling M., Newton R., Wright M., Allen WR.

Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography. *Equine Veterinary Journal* 2012, **44** (suppl.41): 15-21.

Patteson MW.

Diagnostic aids in equine cardiology. In: Patteson M., *Equine Cardiology*, 1^o Ed., Oxford, Wiley-Blackwell; 1996: 70-115.

- Patteson MW., Gibbs C., Wotton PR., Cripps PJ.
Echocardiographic measurements of cardiac dimensions and indices of cardiac function in normal adult Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal* 1995, **19**(Suppl.): 18-27.
- Poppas A., Shroff SG., Korcarz CE., Hibbard JU., Berger DS., Lindheimer MD., Lang RM.
Serial assessment of the cardiovascular system in normal pregnancy: role of arterial compliance and pulsatile arterial load. *Circulation* 1997, **95**: 2407-2415.
- Porciello F.
Metodologia ecocardiografica ed eco-doppler. In: Porciello F., *Ecocardiografia nel cane, nel gatto e nel cavallo*, Poletto Editore, 2004: 2-98.
- Porciello F.
Esame ecocardiografico nel cavallo. In: Porciello F., *Ecocardiografia nel cane, nel gatto e nel cavallo*, Poletto Editore, 2004: 184-210.
- Quintana M., Saha SK., Rohani M., Del Furia F., Bjernby J., Lind B., Brodin LA.
Assessment of the longitudinal and circumferential left ventricular function at rest and during exercise in healthy elderly individuals by tissue-Doppler echocardiography: Relationship with heart rate. *Clinical Science* 2004, **406**: 451-457.
- Reef VB.
Cardiovascular Ultrasonography. In: Reef VB., *Equine Diagnostic Ultrasound*, Philadelphia, WB Saunders, 1998: 215-272.
- Reef VB.
Echocardiographic examination in the horse: the basics. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1990, **12**: 1312-1319.
- Samuel CA., Allen WR., Steven DH.
Ultrastructural development of the equine placenta. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975, **23**: 575-578.

Santschi E., Vaala WE.

Identification of the High-Risk Pregnancy. In: McKinnon AO., Squires EL., Vaala WE., Varner DD., *Equine Reproduction*, 2^o Ed., Chichester, Wiley-Blackwell; 2011: 5-15.

Schefer KD., Bitschnau C., Weishaupt MA., Schwarzwald CC.

Quantitative analysis of stress-echocardiograms in healthy horses with 2-Dimensional (2D) echocardiography, Anatomical M-Mode, Tissue Doppler imaging, and 2D Speckle Tracking. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010, **24**: 918-931.

Schwarzwald CC., Schober KE., Bonagura JD.

Methods and reliability of echocardiographic assessment of left atrial size and mechanical function in horses. *American Journal of Veterinary Research* 2007, **68**:735–747.

Schwarzwald CC., Schober KE., Bonagura JD.

Methods and reliability of Tissue Doppler Imaging for assessment of left ventricular radial wall motion in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2009, **23**:643–652.

Schwarzwald CC., Schober KE., Bonagura JD.

Echocardiographic characterization of left ventricular radial wall motion in horses using tissue Doppler imaging: Methodology and reliability. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007, **21**:590 (Abstract).

Sepulveda MF., Perkins JD., Bowen IM., Marr CM..

Demonstration of regional differences in equine ventricular myocardial velocity in normal 2-year-old Thoroughbreds with Tissue Doppler imaging. *Equine Veterinary Journal* 2005, **37**(3):222-226.

Valensise H., Novelli GP., Vasapollo B., Borzi M., Arduini D., Galante A., Romanini C.

Maternal cardiac systolic and diastolic function: relationship with uteroplacental resistances. A Doppler and echocardiographic longitudinal study. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2000, **15**: 487-497.

vanOppen AC., Stigter RH., Bruinse HW.

Cardiac output in normal pregnancy: a critical review. *Obstetrics and Gynecology* 1996, **87**: 310-318.

Vasapollo B., Novelli GP., Valensise H.

Total vascular resistance and left ventricular morphology as screening tools for complications in pregnancy. *Hypertension* 2008, **51**: 1020-1026.

Voros K., Holmes JR., Gibbs C.

Left ventricular volume determination in the horse by two-dimensional echocardiography: An in vitro study. *Equine Veterinary Journal* 1990, **22**(6): 398-402.

Voros K., Holmes JR., Gibbs C.

Measurement of cardiac dimensions with two-dimensional echocardiography in the living horse. *Equine Veterinary Journal* 1991, **23**(6): 461-465.

Young LE., Rogers K., Wood JLN.

Left ventricular size and systolic function in Thoroughbred racehorses and their relationships to race performance. *Journal of Applied Physiology* 2005, **99**: 1278-1285.