

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

CICLO 34

**Settore Concorsuale:** 07/H4 - CLINICA MEDICA E FARMACOLOGIA VETERINARIA

**Settore Scientifico Disciplinare:** VET/08 - CLINICA MEDICA VETERINARIA

UTILIZZO PRATICO E SIGNIFICATO CLINICOPATOLOGICO DELLE  
FRAZIONI ESCRETE DEGLI ELETTROLITI NEL RICONOSCIMENTO DEL  
DANNO RENALE ACUTO (AKI) IN DIVERSI SETTING CLINICI

**Presentata da: Linda Perissinotto**

**Coordinatore di Dottorato**

**Carolina Castagnetti**

**Supervisore**

**Prof. Francesco Dondi**

**Co-Supervisore**

**Prof. Massimo Giunti**

**Esame Finale anno 2022**

## **INDICE**

1. INTRODUZIONE: IL DANNO RENALE ACUTO
2. IL DANNO RENALE PROVOCATO DA LEPTOSPIROSI VS ALTRE EZIOLOGIE
  - I. Pubblicazione: Comparison of clinicopathological patterns of renal tubular damage in dogs with acute kidney injury caused by leptospirosis and other aetiologies. The Veterinary Journal Volume 266, December 2020, 105573
3. PROSPETTIVE PER STUDI FUTURI SULLA LEPTOSPIROSI ED IL DANNO RENALE
4. FOCUS SULLA SINDROME CARDIO RENALE, DANNO TUBULARE E UTILITA' DELLA CHIMICA URINARIA
  - I. FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME CARDIO RENALE
  - II. DANNO TUBULARE NELLO SCOMPENSO CARDIACO
  - III. MECCANISMO DELLA RESISTENZA AL DIURETICO
5. PRESENTAZIONE DEL LAVORO DI RICERCA SULLE FRAZIONI ECRETE E LORO POTENZIALE LEGAME PER COMPRENDERE MEGLIO IL FENOMENO DELLA RESISTENZA AI DIURETICI
  - I. Pubblicazione: Effect of sampling time on urinary electrolytes following oral furosemide administration in dogs with myxomatous mitral valve disease” (pubblicata su Journal of Veterinary Cardiology)
6. PROSPETTIVE DI STUDI FUTURI SULLA SINDROME CARDIO RENALE E RESISTENZA AI DIURETICI

## **BIBLIOGRAFIA**

## 1. INTRODUZIONE: IL DANNO RENALE ACUTO

La definizione consensuale di danno renale (AKI) (Disease K 2012) è stato un passo importante nella determinazione dell'epidemiologia dell'AKI. L'AKI colpisce il 30-60% dei pazienti critici ed è associato ad alto tasso di morbilità e mortalità in medicina umana (Hoste et al.; 2018). In medicina veterinaria la caratterizzazione dell'AKI avviene considerando i seguenti criteri: esordio acuto (<7 giorni) di sintomatologia suggestiva di AKI (es. depressione del sensorio, vomito, anoressia, oligo-anuria) associata a creatinina sierica >1,4 mg/dl e/o oliguria (produzione urinaria <1ml/kg/h per più di 6 ore dopo adeguata fluidoterapia) in analogia con quanto riportato da Cowgill e collaboratori all'interno del gruppo IRIS ([www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com)).

L'AKI rappresenta un *continuum* di danno renale da clinicamente lieve, a grave insufficienza renale acuta che talvolta richiede la terapia sostitutiva renale. L'International Renal Interest Society (IRIS) ha sviluppato lo schema di valutazione AKI in medicina veterinaria per determinare la classificazione appropriata negli animali con danno renale acuto (Cowgill LD, et al.; 2011).

Negli animali nel 2011 è stato proposto solo uno staging per i cani chiamato VAKI (Veterinary Acute Kidney Injury) come riportato in Figura 2. (Toen ME et al)

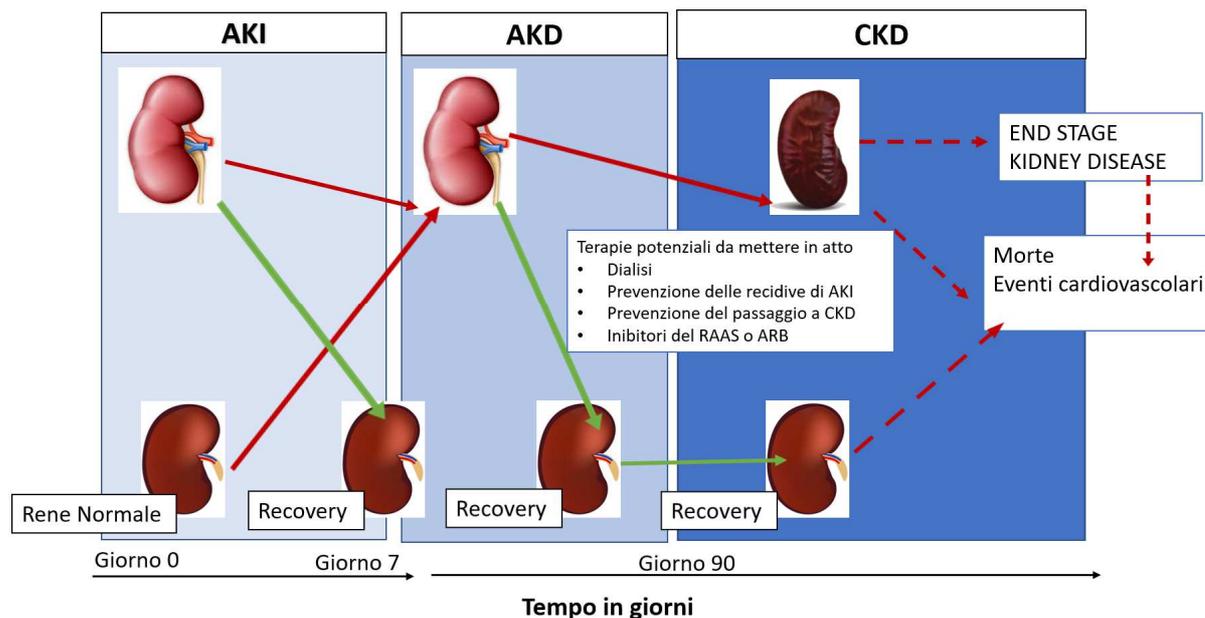
VAKI stage	Criteria
Stage 0	Creatinine increase <150% from baseline
Stage 1	Creatinine increase of 150–199% from baseline OR Creatinine increase of 26.5 $\mu\text{mol/L}$ (0.3 mg/dL) from baseline
Stage 2	Creatinine increase of 200–299% from baseline
Stage 3	Creatinine increase of $\geq 300\%$ from baseline OR An absolute creatinine value >354 $\mu\text{mol/L}$ (4.0 mg/dL)

**FIGURA 1.1** VAKI Staging System da Thoen ME, Kerl ME et al: Characterization of acute kidney injury in hospitalized dogs and evaluation of a veterinary acute kidney injury staging system. *J Vet Emerg Crit Care* 21(6) 2011; 648-657

Lo studio e la caratterizzazione del danno renale acuto, è da intendersi anche oltre il periodo di acuzie, con progressione alla malattia renale cronica (CKD), aumento del rischio di complicanze cardiovascolari, episodi ricorrenti di AKI e mortalità a lungo termine (James et al 2020). La prevenzione dello sviluppo e/o della progressione è attualmente limitata all'ottimizzazione dello stato emodinamico e della fluidoterapia e nell'evitare farmaci o molecole potenzialmente nefrotossiche. La ricerca di un trattamento farmacologico specifico è ostacolata dalla diagnosi tardiva dell'AKI, malattia molto eterogenea con eziologia variabile, fisiopatologia e presentazione clinica e complessa non del tutto chiara. (Kellum et al 2018).

Innanzitutto per inquadrare correttamente la diagnosi e conseguentemente il trattamento, occorre individuare le varie eziologie ed i fenotipi di danno renale acuto.

Negli ultimi anni, in medicina umana, con l'intento di descrivere sempre meglio l'eziologia dell'AKI, alla terminologia già in uso, si è aggiunta quella di *Malattia Renale Acuta (acute kidney disease- AKD)* definita come un episodio di AKI che dura più di 7 giorni, ma ha meno di 90 giorni (Chawla LS, et al.; 2017). Questa definizione, ha lo scopo a colmare il divario tra AKI e CKD (che richiede 3 mesi per la diagnosi). AKD utilizza i criteri della creatinina della definizione KDIGO. È importante notare che la diagnosi di AKD, gravità o apparente guarigione può essere influenzato dalla diminuzione di creatinina sierica correlata alla perdita di massa muscolare associata a malattie critiche croniche (Schetz M, et al.; 2017). La relazione tra AKI persistente, AKD e CKD come così come gli interventi terapeutici e non, che possono interferire con questa evoluzione, richiedono ulteriori studi (Fig. 1.2).



**FIGURA 1.2** In seguito allo sviluppo dell'AKI, sono possibili diversi scenari che possono portare al recupero della funzione renale o ad una disfunzione più prolungata. La malattia renale acuta (AKD) viene valutata tra 7 e 90 giorni dopo l'AKI. Nei pazienti che non migliorano, si instaura una malattia renale cronica (CKD), dopo il giorno 90. I biomarcatori di danno e funzione renale possono essere in grado di affinare la previsione di un rapido recupero (cioè, AKI transitorio) oppure segnalare un passaggio verso la compromissione più persistente della funzione renale; diversi interventi terapeutici possono essere in grado di modulare la progressione del decorso della malattia. Da Pickkers et al.; *Acute kidney injury in the critically ill: an updated review on pathophysiology and management. Intensive Care Med* (2021) 47:835–850. modificato

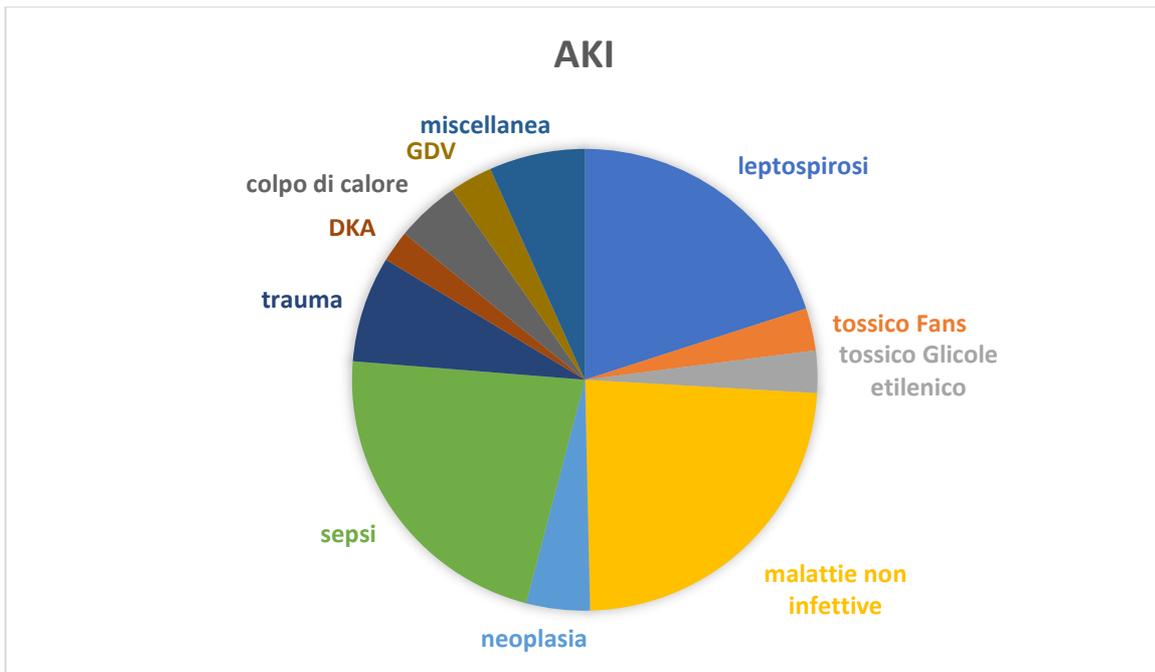
Clinicamente, l'AKI è raggruppata in tre eziologie: pre-renale, volume-respositiva, renale intrinseca e post-renale.

Pre-renale: l'iperazotemia è caratterizzata da una diminuzione della GFR dovuta alla diminuzione della pressione di perfusione renale senza danni il parenchima renale. Le cause post-renali di AKI sono caratterizzate da ostruzione acuta del flusso urinario, correlato ad aumento della pressione intratubulare, alterato flusso, processi infiammatori e diminuzione del GFR (Uchino S, et al.;2010). L'iperazotemia renale è associata ad un danno improvviso di

funzionalità renale e ad una lesione parenchimale, è caratterizzata dall'incapacità dei reni di soddisfare le richieste escretorie, metaboliche ed endocrine del corpo.

Le eziologie per il danno renale intrinseche possono essere difficili da valutare a causa di un'ampia varietà di lesioni che possono verificarsi al rene. In generale, il danno renale può essere suddiviso in quattro principali categorie strutturali: i tubuli, i glomeruli, l'interstizio, e vasi sanguigni intrarenali. Possono verificarsi danni tubulari da danno ischemico (ridotta perfusione renale) o composti nefrotossici (esogeni ed endogeni). Glomerulonefriti acute, secondarie a malattia da immunocomplessi che provoca danno glomerulare. Il danno interstiziale può derivare da nefrite interstiziale acuta, secondaria a farmaci, tossici o infettiva, tra le eziologie si annovera leptospirosi e pielonefrite. Infine, l'eziologia vascolare, possono verificarsi danni secondari a lesioni ai vasi intra-renali (trombosi, ipertensione, ecc.), conseguentemente alla diminuzione della perfusione renale e diminuzione del GFR (Basile, et al.;2012). Ischemia e agenti nefrotossici (ad esempio, alcuni farmaci, piante, glicole etilenico, ecc.) sono la maggior parte delle lesioni renali in medicina umana e anche medicina veterinaria (Legatti et al.;2018)

Nel grafico di Figura 1.3 sono rappresentate le varie eziologie di danno renale acuto riscontrate nel nostro Ospedale durante un precedente lavoro pubblicato (Troia et al.,2018). La popolazione studiata riflette la maggior parte delle eziologie più riscontrate nella pratica clinica in medicina veterinaria.

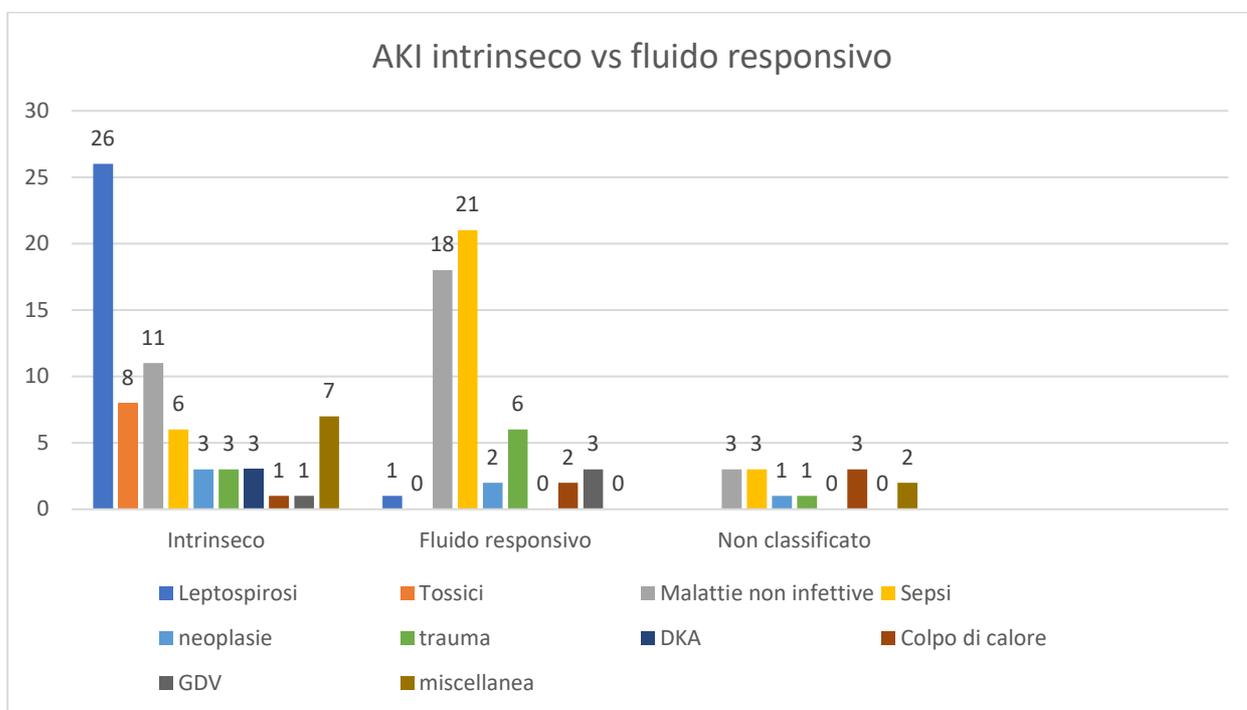


**FIGURA 1.3:** Eziologia AKI nella popolazione di Studio Ospedale Didattico Universitario Bologna. Da Troia R, Gruarin M, Grisetti C, Serafini F, Magna M, Monari E, et al: Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: Diagnostic and prognostic implications. *J Vet Intern Med.* 2018;1–11.

Sono stati adottati i termini AKI "volume-responsivo" e "intrinseco", presi in prestito dalla medicina umana per migliorare la classificazione di "pre-renale" danno "renale parenchimale" (Himmelfarb, et al 2008; Makris, et al 2016;).

Si definisce come AKI intrinseco un danno strutturale del parenchima renale, mentre come AKI volume-responsivo una transitoria riduzione della funzionalità renale, che può migliorare dopo adeguata fluidoterapia in poche ore (Himmelfarb, et al 2008; Makris, et al 2016;). In medicina veterinaria Cowgill definisce un paziente volume responsivo quel paziente che dopo 6 ore di fluidoterapia produce > 1 ml/kg/h di urine oppure la cui creatinina diminuisce in 48 ore dal baseline iniziale (<http://www.iris-kidney.com/guidelines/grading>). Nella Figura 1.4 sono

rappresentati gli stessi pazienti appartenenti al gruppo di studio citato precedentemente (Troia et al.,2018) raggruppati per AKI intrinseco e fluido responsivo. Questi gruppi rispecchiano la casistica clinica frequentemente riscontrata nella pratica veterinaria.



**FIGURA 1.4:** *Eziologia AKI volume responsivo vs intrinseco nella popolazione di Studio Ospedale Didattico Universitario Bologna. Da Troia R, Gruarin M, Grisetti C, Serafini F, Magna M, Monari E, et al: Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: Diagnostic and prognostic implications. J Vet Intern Med. 2018;1–11.*

L'obiettivo che ci siamo posti in questi tre anni di Dottorato di Ricerca è di andare a caratterizzare meglio la diagnosi di AKI.

Sebbene il rene abbia molte funzioni, l'AKI è principalmente definita come una diminuzione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR). In Medicina Umana il gruppo di lavoro KDIGO ha proposto una definizione di consenso ed un sistema di stadiazione per la pratica clinica (il KDIGO) che si basa sull'aumento della creatinina sierica (Scr) entro 7 giorni e/o presenza di oliguria, entrambi marcatori surrogati di GFR. Questa definizione ha consentito di snellire la

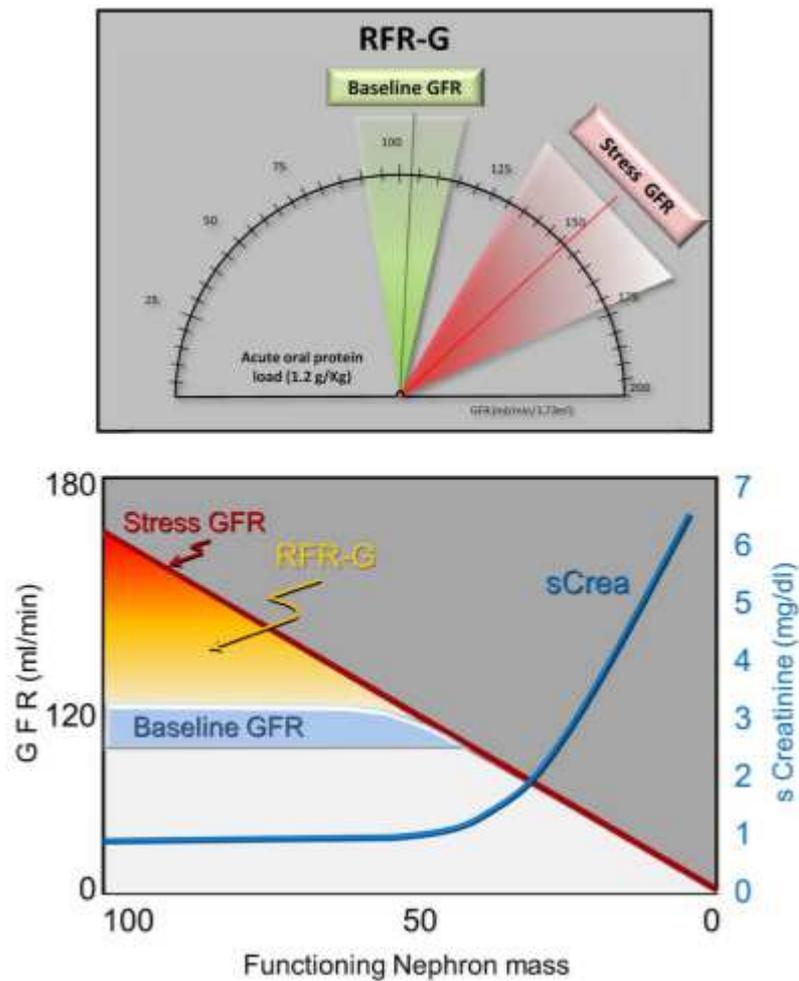
ricerca sul campo. Tuttavia, sia Scr che la produzione di urina possono anche essere influenzati da fattori non renali e non correlati alla GFR e sono, quindi, marcatori imperfetti di GFR ridotta (Schetz et al 2017). Di conseguenza, la diagnosi di AKI secondo i criteri KDIGO dovrebbe essere interpretata nel contesto clinico. Nella pratica clinica per valutare la gravità del danno renale acuto, ci si concentra sul trend della creatinina e sulla produzione urinaria, indicando come l'oliguria o oligo-anuria sia un indicatore della funzione renale che identifica i pazienti con outcome peggiore. (Priyanka et al., 2020; Kellum et al., 2015). Attualmente, anche in medicina veterinaria, come endpoint per la malattia renale cronica, si valuta la progressione verso lo stadio finale, attraverso la misurazione della concentrazione di creatinina sierica, l'urea e il peso specifico urinario (Cobrin et al., 2013). Questi ultimi rappresentano dei biomarker tardivi e si rende, perciò, necessario l'utilizzo di altre variabili in grado di determinare precocemente l'insorgenza/instaurarsi di un danno renale.

Inoltre, la valutazione della funzionalità renale può essere impattata a causa della lunga emivita di creatinina e la presenza di capacità di riserva renale che può essere reclutata prima che il GFR basale inizi a diminuire. (Ronco et al., 2017).

Ronco, Bellomo e collaboratori, per spiegare il concetto che la creatinina è un marker tardivo di funzione renale utilizzano il concetto di *unstressed GFR* o GFR di riferimento (non sollecitato).

Una comprensione di GFR è essenziale per il concetto di capacità renale residua. In medicina veterinaria, per comprendere questo concetto, si fa il parallelismo con la medicina umana, i giovani adulti hanno un GFR basale tra 100 e 130 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. I valori dipendono dall'età, dal sesso e dalle dimensioni corporee e variano considerevolmente tra gli individui sani. Sono notevolmente stabili, sebbene vi sia un calo correlato all'età di 0,8 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>/anno dopo l'età di 30 anni. In generale, il livello di creatinina sierica tende a rimanere relativamente normale fino a circa il 50% dei nefroni vengono persi o quando il GFR si avvicina a 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.

Per questo motivo la creatinina sierica non è un valore accurato marker di funzione renale quando il GFR è  $>60$  ml/ min/1,73 m<sup>2</sup>. In questo stesso contesto, il GFR stimato non è un indice sensibile per la diagnosi precoce della malattia renale. Gli autori, per rafforzare il concetto, riportano un esempio: i donatori di rene hanno livelli di creatinina sierica e GFR stimato "normali" nonostante abbiano perso metà della loro massa di nefroni. Pertanto, un aumento della creatinina sierica si verifica solo dopo, quando i nefroni residui non possono più compensare la perdita della funzione d'organo globale (Fig. 1.5). Date queste limitazioni, la valutazione della capacità renale residua può fornire un modo più sensibile di valutazione della funzionalità renale.



**FIGURA 1.5** da Ronco C, Bellomo R, Kellum J (2017) *Understanding renal functional reserve. Intensive Care Med* 43(6):917–920.

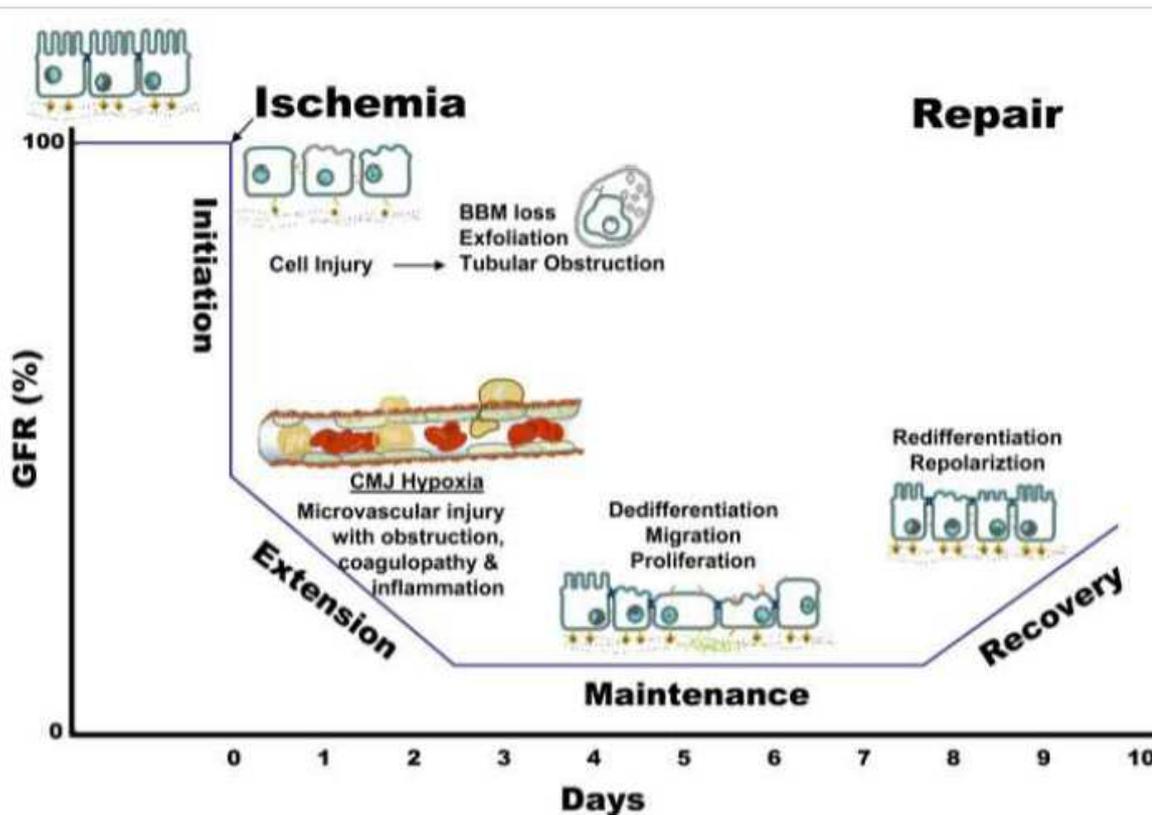
Risposta tipica della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) basale dopo stimolazione con un pasto orale (1,2 g di proteine della carne/kg di peso corporeo (PC) o 1 g di proteine in polvere/kg di peso corporeo). Il picco o il GRF massimo (=Stress GFR) si ottiene dopo 2 h. La differenza tra lo stress GFR e il GFR di base (GFR non stressato) rappresenta la riserva funzionale renale della funzione glomerulare (RFR-G). Il GFR di base dipende da molti fattori, inclusa la dieta e assunzione di liquidi. Tuttavia, ogni persona ha la capacità di aumentare il GFR in risposta a stimoli diversi in misura dipendente dalla quantità di massa renale intatta. Quando la massa renale viene persa, lo Stress GFR diminuisce in una funzione quasi lineare. La creatinina sierica (sCr) tende ad aumentare quando >50% di la massa renale è compromessa. La RFR è ancora presente ogni volta che il GFR basale è inferiore al GFR da stress a un dato valore per la massa renale funzionante.

Potenziati soluzioni per un rilevamento più tempestivo di un GFR ridotto potrebbe essere la misurazione della clearance della creatinina su 2 o 4 h, GFR stimato calcolato da due

misurazioni seriali della creatinina, tutte metodiche che si allontanano dal setting clinico in emergenza e che ancor meno sono riportabili nella medicina veterinaria, se non in setting specifici di ricerca. In medicina veterinaria la misurazione della velocità di filtrazione glomerulare rimane il *gold standard* per valutare la funzionalità renale ma il metodo è time-consuming, invasivo e non facilmente attuabile nella pratica clinica.

L'AKI viene descritta in quattro stadi, riportati in Figura 1.6. Il primo, chiamato anche fase iniziale, avviene durante e immediatamente dopo l'insulto renale. Il secondo stadio, fase estensiva, è quello in cui l'ischemia, l'ipossia, l'infiammazione e il danno cellulare continuano, con apoptosi

cellulare, necrosi o entrambe. Le anomalie cliniche e di laboratorio potrebbero non essere evidenti nei due stadi iniziali. Nel terzo stadio, detto di mantenimento è caratterizzato da iperazotemia, o entrambi e può durare per giorni o settimane. L'oliguria, definita come una produzione di urine inferiore a 0,5 millilitri, per chilo di peso per ora, o l'anuria definita come assenza di produzione di urina, potrebbero essere presenti in questo stadio, infatti, la produzione urinaria è molto variabile in questo stadio. Il quarto stadio è la fase chiamata di recupero "recovery", durante la quale, l'iperazotemia migliora e i tubuli renali si stanno riparando. In questa fase potremmo notare una poliuria marcata, come risultato di una parziale riparazione della funzionalità tubulare e della diuresi osmotica provocata dai soluti accumulati. La funzionalità renale può ritornare normale, oppure il paziente presenterà una disfunzione renale, che sarà valutata come la capacità renale residua.



**Figura 1.6. I quattro stadi dell'AKI.** da Basile DP, Anderson MD et al: *Pathophysiology of Acute Kidney Injury. Compr Physiol.* 2012 April; 2(2):1303–1353

La ricerca in medicina umana di biomarker di danno renale continua, ma è difficile. Questo è dovuto alla difficoltà in questo ambito di trovare degli endpoint clinici che supportino anche la sopravvivenza.

Il biomarker ideale in ambito nefrologico dovrebbe essere in grado di:

- ✓ diagnosticare un danno renale in fase precoce;
- ✓ localizzare l'insulto renale (glomerulare, tubulare o entrambi);
- ✓ differenziare il danno renale in pre, post o non renale;
- ✓ predirne la gravità;
- ✓ monitorare gli effetti del trattamento farmacologico.

Per essere applicabile in ambito clinico, il marker deve essere accurato, facile da misurare e non invasivo per il paziente (De Loor et al., 2013).

Fino a questo momento, in medicina veterinaria in corso di AKI si è utilizzata la valutazione della concentrazione di creatinina sierica, marker poco sensibile e tardivo, come detto in precedenza. Quindi c'è un notevole interesse a ricercare nuovi biomarker che possono aiutare nella diagnosi di patologie renali acute e tra le varie eziologie nel differenziarne il meccanismo eziopatogenetico.

La chimica urinaria, compresa la valutazione della frazione di escrezione (FE) di elettroliti, sono utilizzati nella valutazione di AKI in medicina umana che mira a differenziare tra danno renale funzionale e strutturale e fornire informazioni prognostiche (Makris K, et al.; 2016)

In particolare, l'AKI volume responsivo è caratterizzato da una bassa (<1%) FE di sodio (FENa), aumento (> 35%) FE dell'urea (FEurea) e aumento della creatinina urinaria (uCr)/sCr ratio (uCr/sCr; >40) (Makris et al.;2016; Troia et al.; 2018). L'utilità diagnostica delle frazioni escrete nella pratica clinica, è stata messa in discussione a causa dell'impatto di diversi fattori confondenti (somministrazione di diuretici o vasopressori, fluidoterapia o eziologie specifiche di AKI) (Prowle et al.; 2012; Vanmassenhove, et al.; 2013).

La frazione escreta di elettroliti è stata recentemente rivalutata nei cani con AKI come interessante marker di danno tubulare e funzionalità renale, semplice, poco costoso e di rapida esecuzione (Brown, et al.; 2015; Segev et al.;2015). La frazione escreta del sodio si è dimostrato un marker precoce e accurato di AKI in una popolazione di cani con colpo di calore naturale nonostante la rianimazione con fluidi (Segev et al.;2015). Inoltre, un recente studio ha valutato il valore prognostico di cambiamenti sequenziali della velocità di filtrazione glomerulare (GFR), output urinario e escrezione renale di soluti in 10 cani con AKI naturale. (Brown et al.;2015). Un aumentato GFR e output urinario e una diminuzione della FENa durante il ricovero sono stati associati con recupero renale e sopravvivenza in questa popolazione (Brown et al.; 2015). L'interesse per le frazioni escrete è crescente in medicina veterinaria ed un precedente lavoro

del gruppo di Nefrologia dell'Università di medicina Veterinaria di Bologna si ipotizza che la FE di elettroliti e urea potrebbe predire precocemente l'insorgenza di AKI volume responsivo o intrinseco nei cani e che il grado AKI e la chimica urinaria possano avere un valore prognostico durante l'AKI (Troia et al ,;2018).

## 2. IL DANNO RENALE DA LEPTOSPIROSI VS DANNO RENALE DA ALTRE EZIOLOGIE

In corso di AKI è riportata ipokaliemia a causa di perdita di potassio renale e aumento della kaliuresi. Un setting clinico di frequente riscontro è nelle infezioni da Leptospirosi nel cane.

La nefrite tubulo interstiziale è un reperto clinico-patologico comune nella leptospirosi canina, vari disturbi elettrolitici associati con AKI sono stati descritti in questa malattia, incluse iponatremia, ipocloremia e ipokaliemia. Tuttavia, vi è una scarsa letteratura veterinaria che abbia eseguito la misurazione simultanea degli elettroliti urinari per dimostrare il danno renale, per cui uno degli obiettivi che ci siamo posti durante il Dottorato di Ricerca era di approfondire questo aspetto. In letteratura è stato documentato un caso di ipokaliemia refrattaria grave, associata a kaliuresi inappropriata, in un cane con diagnosi di leptospirosi.

I cani con AKI intinseca da leptospirosi (iAKI-Lepto) hanno una frazione di escrezione del potassio (FeKa) ed una glicosuria molto maggiore rispetto ai cani con AKI dovuta ad altre eziologie (iAki Others).

L'aumento dell'escrezione urinaria di potassio descritto nei cani iAKI-Lepto inclusi in questo studio, rispetto a iAki Others potrebbero riconoscere gli stessi meccanismi molecolari indagati in medicina umana e nei modelli animali della malattia, come l'inibizione della pompa Na-K ATPasi, l'aumento della concentrazione plasmatica di aldosterone e cortisolo e compromissione del co-trasporto di Na-K-Cl nell'ansa di Henle.

Esistono diversi meccanismi coinvolti nella perdita renale di potassio nella leptospirosi. La maggior parte degli elettroliti filtrati, inclusi sodio e potassio, sono riassorbiti nel tubulo prossimale. Nella leptospirosi, il tubulo contorto prossimale è principalmente coinvolto.

L'espressione dell'isoforma nella pompa che scambia sodio idrogeno (*sodium hydrogen exchanger isoform 3*) (NHE3), nella membrana apicale del tubulo prossimale è

significativamente ridotta, il risultato finale è una quantità maggiore di sodio e potassio che arrivano alle parti distali del nefrone. Il co-trasportatore  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  nella branca ascendente dell'ansa di Henle è sovra-regolato per compensare la maggiore perdita di sodio e la pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  nel segmento distale riassorbe più sodio in cambio di una maggiore perdita urinaria di potassio (Seguro et al.;1990; Abdulkader et al.;2008; Allen et al.; 2016.).

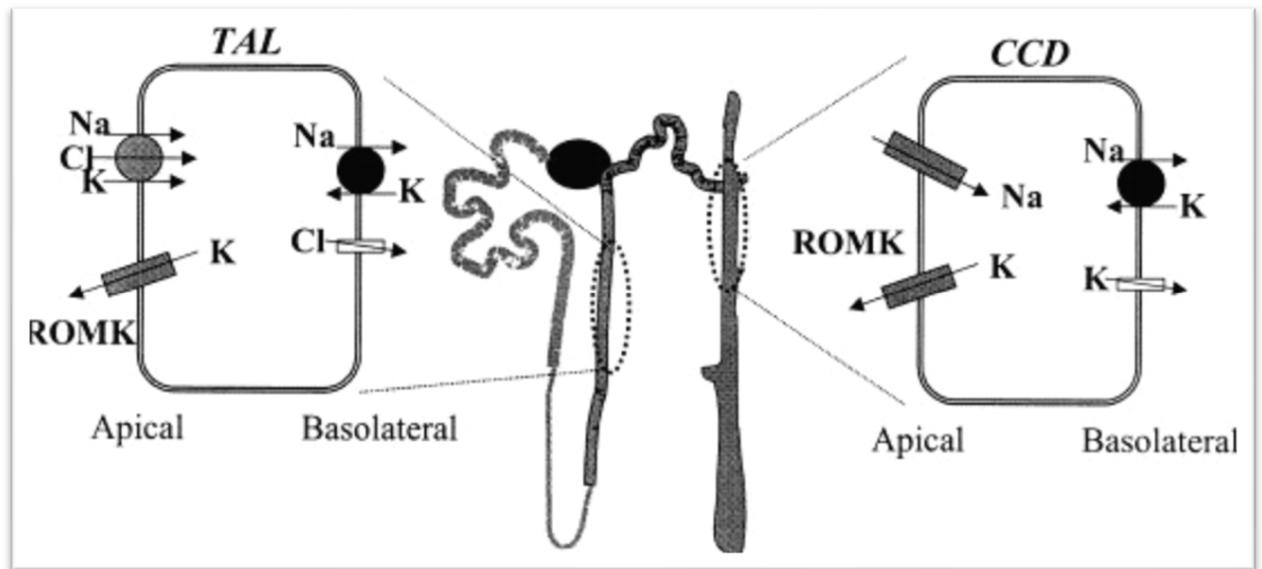
La perdita urinaria di potassio in corso di leptospirosi può essere importante e si parla di ipokaliemia nel 35% dei cani e nel 46% delle persone affette da questa malattia.

È descritta una grave ipokaliemia che ha causato una paralisi flaccida riportato in persone con insufficienza renale non oligurica causata dalla leptospirosi (Tangeman et al.; 2013).

La paralisi flaccida da ipokaliemia causata da la leptospirosi non è stata precedentemente segnalata nei cani (Allen et al.;2013).

Quindi, l'aumento della kaliuresi documentata potrebbe riflettere la presenza di una più grave compromissione tubulare nei cani con leptospirosi.

Ci sono 2 tipi dei canali apicali del potassio nella parte finale del tubulo distale e cellule del dotto collettore corticale che regolano la secrezione del potassio: i canali del potassio della midollare esterna renale (Renal Outer Medullary Potassium Channel- *ROMK*) che mediano la secrezione basale oppure la secrezione di potassio non stimolata dal flusso e *maxi-K* canali, che mediano la secrezione di potassio della stimolata dal flusso. Figura 2.1.



**FIGURA 2.1** Abbreviazioni: TAL thick ascending limb (TAL); CCD cortical collecting duct (CCD) I canali ROMK topografia e funzionamento. Da Wen-Hui, Dao-Hong L, Hyacinth S: Regulation of ROMK Channels by Protein Tyrosine Kinase and Tyrosine Phosphatase. Trends in Cardiovascular Medicine. 2002. Vol 12, Issue 3, Pages 138-142

I canali del potassio della midollare esterna ROMK sono canali K rettificanti verso l'interno “inward-rectifying” quindi consentono preferenzialmente al potassio fluire nella cellula anziché fuori dalla cella, e sono depolarizzati dal riassorbimento del sodio, che stabilisce il gradiente chimico per aumentare la secrezione il potassio. Questa proprietà è molto importante per la funzione fisiologica dei canali ROMK poiché sono responsabili del riciclo di K nella branca ascendente (TAL) e della secrezione di K nel dotto collettore corticale (CCD).

Fornire concentrazione intracellulare di magnesio è importante; i canali ROMK sono bloccati dal magnesio che limita così la quantità di potassio secreto nel lume tubulare. Pertanto, l'integrazione di magnesio è vantaggiosa nel trattamento di ipokaliemia refrattaria per bloccare i canali ROMK e limitare l'ulteriore secrezione renale di potassio. Nel case report di Allen et al, il magnesio ionizzato è considerevolmente basso, in analogia con la letteratura in medicina

umana (Seguro et al.; 2013) per cui è consigliata la supplementazione di magnesio per correggere l'ipokaliemia.

Un altro dato peculiare documentato nei cani iAKI-Lepto rispetto a iAKI-Othes è la maggiore glucosuria, espressa come glicosuria urinaria rapportata alla creatinina urinaria (Glucosio urinario: Creatinina urinaria; uGlu:uCr) che rispecchia la maggiore frequenza di glucosuria rilevata nella valutazione del dipstick urinario.

La spiegazione fisiopatologica dell'alterazione del potassio renale e della perdita di glucosio nei cani con leptospirosi è legata alla fisiologia dell'assorbimento di entrambi a livello del tubulo prossimale, pertanto, un danno selettivo ai segmenti tubulari prossimali coinvolti potrebbe suggerire un riassorbimento di potassio e glucosio alterato in corso di leptospirosi.

In uno studio prospettico in medicina umana su 11 pazienti, la frazione escreta del potassio, inizialmente elevata, è in seguito diminuita. contemporaneamente all'elevata escrezione urinaria di sodio e al rapporto K/Na urinario, suggerendo un aumento della secrezione di potassio distale, a causa di un aumento della *delivery* di sodio distale conseguente a compromissione funzionale del riassorbimento prossimale del sodio (Seguro et al.;1990).

#### Descrizione del lavoro pubblicato su The Veterinary Journal

Zamagni S, Troia R, Zaccheroni F, Monari E, Grisetti C, Perissinotto L, Balboni A, Dondi F. Comparison of clinicopathological patterns of renal tubular damage in dogs with acute kidney injury caused by leptospirosis and other aetiologies. Vet J. 2020 Dec;266:105573. doi: 10.1016/j.tvjl.2020.105573. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33323170.

Abbiamo confrontato un gruppo di cani con leptospirosi e danno renale acuto con un gruppo di cani affetti da AKI ma sostenuto da cause diverse dalla leptospirosi. In queste due popolazioni di pazienti sono stati valutati biomarker di AKI come NGAL e una serie di analiti sierici e urinari come ad esempio l'escrezione elettrolitica frazionata.

I cani con leptospirosi, in particolare hanno mostrato maggiore kaliuresi e più grave glicosuria rispetto a quelli non affetti da leptospirosi, così come erano più frequentemente glicosurici rispetto agli altri. Questi dati sono in analogia con quanto è riportato nell'uomo e dimostrano un pattern di danno tubulare tipico in corso di questa malattia se paragonato appunto ad altre cause di danno tubulare acuto e AKI.

I dati di questo studio stati pubblicati su The Veterinary Journal, segue articolo.

The Veterinary Journal 266 (2020) 105573

Contents lists available at ScienceDirect

 **The Veterinary Journal** 

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)

---

## Comparison of clinicopathological patterns of renal tubular damage in dogs with acute kidney injury caused by leptospirosis and other aetiologies



S. Zamagni, R. Troia, F. Zaccheroni, E. Monari, C. Grisetti, L. Perissinotto, A. Balboni, F. Dondi\*

*Department of Veterinary Medical Sciences, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy*

---

**ARTICLE INFO**

**Article history:**  
Accepted 30 October 2020

**Keywords:**  
Electrolyte fractional excretion  
Kaliuresis  
NGAL  
Urine chemistry  
Urine glucose

**ABSTRACT**

In humans, leptospiral acute kidney injury (AKI) is characterised by tubulointerstitial involvement and renal electrolyte losses, impacting clinical presentation and case management. The aim of this study was to evaluate urine chemistry findings in dogs with leptospirosis in order to identify characteristic patterns of tubular damage associated with this disease. Dogs with intrinsic AKI caused by leptospirosis and by other aetiologies were prospectively enrolled. Clinical and clinicopathological variables, including serum and urine chemistry, fractional excretion (FE%) of electrolytes, and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), were evaluated in both groups and compared statistically.

Dogs with leptospirosis ( $n = 38$ ) had significantly higher serum creatinine concentration than dogs with AKI caused by other aetiologies ( $n = 37$ ). Serum potassium and glucose concentrations were comparable between groups. Dogs with leptospiral AKI had significantly higher FE of potassium (median 100%, range 20–480 vs. median 68%, range 5–300;  $P = 0.048$ ), as well as higher magnitude of glucosuria (urine glucose to creatinine ratio, median 0.64, range 0–26 vs. median 0.22, range 0–13;  $P = 0.023$ ) and frequency of positive glucose dipstick reaction (59% vs. 18%;  $P = 0.002$ ), than dogs with AKI of other aetiologies. Additional markers of tubular damage considered in this study, including FE of other electrolytes and urinary NGAL, did not differ between groups. In conclusion, when compared to other aetiologies of intrinsic AKI, canine leptospirosis was characterised by increased glucosuria and kaliuresis.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Leptospirosis is a multiorgan disease and a common cause of acute kidney injury (AKI) in humans and dogs (Brown et al., 2015; Schuller et al., 2015; Troia et al., 2018a). Leptospiral AKI typically causes structural parenchymal damage, leading to intrinsic AKI (iAKI),

associated with acute interstitial nephritis with proximal tubular involvement (Nally et al., 2004; De Brito et al., 2006; Schuller et al., 2015). Glucosuria, proximal renal tubular acidosis and impaired sodium reabsorption have been described in human and experimental animal infections (Seguro et al., 1990; Magaldi et al., 1992; Wu et al., 2004). Hypokalaemia due to increased kaliuresis, and less commonly, dysfunction of the thick ascending limb of the Loop of Henle, causing renal magnesium and phosphate wasting, have also been documented (Seguro et al., 1990; Abdulkader et al., 1996; Daher Ede et al., 2004; Khositseth et al., 2008). Various electrolyte disturbances have been described in spontaneous canine leptospirosis, including hyponatraemia, hypo-chloroemia and hypokalaemia (Navarro et al., 1981; Mastroilli et al., 2007; Knöpfler et al., 2017) and a case report describing severe refractory hypokalaemia associated with inappropriate kaliuresis has been published (Allen et al., 2016). Despite the clinical utility of urine chemistry and fractional excretion (FE) of electrolytes in the characterisation of AKI and the early differentiation of iAKI from transient volume-responsive AKI (vrAKI; Brown et al., 2015; Segev et al., 2015; Troia et al., 2018a; Monari et al., 2020), comparisons of these laboratory parameters in AKI of various aetiologies have not previously been investigated. Additionally, published reports of complete urine chemistry and urinary electrolyte analysis in canine leptospirosis are currently lacking. The aim of this study was to compare urine chemistry findings in dogs with leptospiral iAKI and those with iAKI caused by other aetiologies, focusing on urine glucose and renal electrolyte excretion. We hypothesised that, as for published human studies, leptospirosis would lead to the development of characteristic patterns of tubular damage and urine electrolyte wasting in dogs.

### **Materials and methods Study design, inclusion criteria and grouping.**

This was a prospective study conducted at the veterinary university hospital of the University of Bologna (January 2015–January 2017) and approved by the local Scientific and Ethical

Committee (Approval number, ID 751; Approval date, November 2014). Dogs with spontaneously occurring iAKI were enrolled; iAKI was defined as acute (<7 days) onset of clinical signs, persistent azotaemia (serum creatinine [sCr] >1.6 mg/dL) >48 h and/or persistent oliguria/anuria over 6 h despite appropriate fluid therapy, once euvolaemia was achieved, as previously reported (Troia et al., 2018a). Signalment, history, clinical, clinicopathological and imaging findings at the time of admission were recorded for each enrolled dog. Exclusion criteria included historical, clinical, laboratory and imaging findings suggestive of chronic kidney disease (CKD; e.g. reported signs of polyuria/ polydipsia or weight loss; palpable kidney abnormalities; previously reported azotaemia or persistent proteinuria; ultra- sound evidence of kidney abnormalities of chronic duration), AKI on CKD, vrAKI (evidence of increase in urine production >1 mL/ kg/h over 6 h of adequate fluid therapy, or decrease in serum creatinine concentrations to baseline over 48 h; Troia et al., 2018a), postrenal AKI (e.g. uroabdomen, obstruction), endocrinopathies associated with the potential to promote hyper-glycaemic glucosuria or inappropriate electrolyte wasting (e.g. diabetes mellitus, Addison disease, Cushing disease), and finally, administration of drugs known to increase urinary electrolyte excretion (e.g. diuretics, hypertonic saline, glucose) or interfere with tests used to measure urine glucose (e.g. ascorbic acid, beta- lactam antimicrobials).

Dogs were tested to confirm or exclude leptospiral infection as the underlying cause of iAKI with a combination of specific tests. Leptospirosis was diagnosed by: (1) a positive microagglutination test (MAT) at the time of hospital admission (titre > 1:800); (2) a four-fold increase in the convalescent MAT titre performed on serum sample collected 7–14 days after admission; (3) a positive real-time quantitative PCR (qPCR) on blood, urine, or both; (4) a positive in-clinic rapid test detecting circulating IgM (WITNESS Lepto, Zoetis). Dogs vaccinated for leptospirosis within 15 weeks of admission were excluded (Troia et al., 2018b). Positive results on rapid testing were further confirmed by qPCR, MAT, or both. Dogs with at

least one positive test result were diagnosed with leptospirosis and assigned to the iAKI-Lepto group. Dogs with negative leptospiral infection results and an alternative recognised cause of iAKI were assigned to the iAKI-Other group. Dogs that recovered and were discharged alive from the hospital were classified as survivors, while dogs that died despite medical treatment or were euthanised were classified as non-survivors.

### **Clinical and clinicopathological data**

Blood sampling and complete clinical and laboratory data were collected and analysed at the time of hospital admission (simultaneously with AKI diagnosis); clinical monitoring was performed and recorded during hospitalisation. Clinical data included bodyweight, body temperature, heart rate, respiratory rate, non-invasive systolic blood pressure measurement, hydration and volume status, and urinary output (UO). For the purposes of the study, UO was measured to make the diagnosis of AKI commencing at the time of hospital admission. Once fluid resuscitation had been performed and fluid therapy instituted for at least 6 h, UO was used to classify AKI type (vrAKI vs. iAKI), as previously reported (Troia et al., 2018a), and was then monitored during hospitalisation. Dogs were graded according to the IRIS AKI grading system at the time of enrolment, and were treated based on the assessment by attending clinicians and nephrologists. No renal replacement therapies were performed. Blood samples were collected by standard venepuncture using a blood vacuum collection system; concurrent spot urine samples were obtained by cystocentesis, catheterisation or spontaneous voiding prior to the administration of fluid therapy. All specimens were processed and analysed within 1 h after sampling. At the time of admission in the study, the following analyses were performed in all dogs: venous or arterial blood gas analysis; complete blood count (CBC) and blood smear microscopic evaluation; chemistry profile; urinalysis, including urine specific gravity (USG), dipstick examination, microscopic sediment evaluation, and urine chemistry including the

measurement of urinary creatinine (uCr), proteins, electrolytes, urea, glucose (uGlu), and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Pigmented urine specimens were excluded from analyses. If there was pyuria (>5 white blood cells/high-power field) on fresh urine sediment evaluation, specimens were excluded from urinary NGAL analysis, as previously reported (Monari et al., 2020).

### **Laboratory methods**

Diagnosis of leptospirosis was achieved as previously reported (Troia et al., 2018b). Blood gas analysis was determined by a blood gas analyser (ABL 800 Flex, Radiometer Medical ApS). CBC was obtained using an automated haematology system (ADVIA 2120, Siemens Healthcare Diagnostics). Serum and urine chemistry were determined using an automated chemistry analyser (AU 480, Olympus/Beckman Coulter). C-reactive protein was measured using immunoturbidimetric assays (CRP OSR6147, Olympus/Beckman Coulter), previously validated in our laboratory for dogs (Gentilini et al., 2005). Urine dipstick analysis was performed using a commercially available method (Combur-Test 10 UX, Roche); glucose was detected at a minimum concentration of 50 mg/dL. Dipstick analysis was performed using an automated reader (URISYS 1100, Roche) and results were confirmed by visual inspection. Microscopic urine sediment examination was performed at 100X (low-power field, LPF) and 400X (high-power field, HPF). Tubular granular casts were considered as present or absent and graded as follows: >2 at LPF, 1+; >6 LPF 2+; and >10 LPF, 3 +. Urinary proteins (pyrogallol red), uGlu (hexokinase) and uCr (Jaffe's reaction) were measured using commercially available colorimetric methods (Urinary/CSF Protein OSR6170, Glucose OSR6121 and Creatinine OSR6178, Olympus/Beckman Coulter). The following ratios were calculated: uCr to sCr (uCr:sCr), urine proteins to uCr (UPC), and uGlu to uCr (uGlu:uCr). FE of electrolytes including

FE of sodium (FENa), potassium (FEK), chloride (FECl), calcium (FECa), phosphate (FEP), magnesium (FEMg), and urea were calculated according to a previously reported equation and expressed as % (Brown et al., 2015).

Aliquots of the urine supernatant were stored at -80 °C and used for urinary NGAL evaluation. NGAL was measured by using a commercial ELISA sandwich assay according to the manufacturer's instructions (Dog NGAL ELISA Kit, BIOPORTO Diagnostics), as previously reported (Monari et al., 2020). The results were expressed as absolute urinary NGAL concentration (uNGAL; pg/ mL) and uNGAL to uCr ratio (uNGAL:uCr, pg/mg).

### **Statistical methods**

Assuming that there would be 40% dogs in the iAKI-Other group and 80% in the iAKI-Lepto group with glucosuria, respectively, and a mean increase of 25% in FEK in the iAKI-Lepto group compared to iAKI-Other group (Troia et al., 2018a), to achieve 80% statistical power based on the assumption of a 1:1 case ratio and a 5% type I error rate ( $\alpha$ ), a minimum of 24 dogs was to be enrolled in each group. After checking for normality (graphical evaluation and Shapiro–Wilk test results), data were evaluated using standard descriptive statistics and presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median and range (minimum–maximum), if normally or not normally distributed, respectively. Results were compared between iAKI-Lepto and iAKI-Other groups using Student's t test or Mann-Whitney U test, based on data distribution. Categorical data were compared using Fisher exact or Chi-square tests (frequency of granular cast). Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to determine optimal cut-off values (OCV) with the maximal sum of sensitivity (Se) and specificity (Sp) for variables discriminating between iAKI-Lepto and iAKI-Other groups. ROC curve analysis was used to separately evaluate the accuracy of FEK, uGlu: uCr and dipstick glucosuria (negative vs. positive dipstick reaction). Results of the area under the ROC curve (AUC) were reported

with their 95% confidence intervals (CI) and accuracy was classified as weak (0.6–0.7), moderate (0.7–0.8), or strong (0.8–1.0). Variables of interest that differed in the iAKI-Lepto and iAKIOther group were entered into a multivariate model (stepwise approach removing factors with  $P \geq 0.05$ ) to correctly identify iAKI-Lepto cases. To avoid collinearity, in the case of collinear variables, only the most significant variable at the initial statistical comparison was entered into the model. Binary logistic regression results were presented as odds ratio (OR) and 95% CI. Results of all

statistical tests were considered significant at  $P < 0.05$ . Statistical analysis was performed using statistical software available online (MedCalc Statistical Software version 19.0.7, MedCalc Software bvba).

## **Results**

AKI was suspected during the study period in 181 dogs (excluding post-renal cases); 22 cases were excluded because they were diagnosed with AKI on CKD, eight cases were excluded because of underlying endocrinopathies and 18 dogs were excluded due to the administration of drugs known to interfere with the results of the analytes of interest (furosemide, hypertonic saline, mannitol and beta-lactam antimicrobials). Of the remaining 133 dogs with AKI, 45 dogs had vrAKI, five dogs did not have a clear classification of vrAKI vs. iAKI, and in eight dogs, no underlying condition that could be associated with AKI could be identified. Seventy-five dogs with iAKI were enrolled in the study: 38/75 (51%) were diagnosed with leptospirosis and assigned to the iAKI-Lepto group, while 37/75 (49%) were assigned to the iAKI-Other group. Summary results for the tests used in the diagnosis of leptospirosis in dogs in the iAKI-Lepto group are reported in Table 1. Underlying aetiologies and comorbidities diagnosed in the iAKI-Other group were as follows: non-infectious inflammatory disease ( $n = 14/37$ ); toxic ingestion

(n = 8/37); sepsis (n = 8/37); trauma (n = 4/37); and neoplasia (n = 3/37). None of these dogs tested positive for leptospiral infection using the criteria reported above. In the iAKI-Lepto group, median age was 6 years (3 months–12 years), median bodyweight was 24 kg (range, 4.1–49.9), and there were 25 (65.8%) males (one castrated) and 13 (34.2%) females (seven spayed). In this group, there were 12 mixed breed, five Dachshunds, four Labrador retrievers, three German shepherds, two Jack Russell terriers, and 12 other breeds. Dogs in the iAKIOther group had a median age of 7 years (range, 3 months–14 years) and a median bodyweight of 12.2 kg (range, 1.3–42.6); 15 (40.5%) were males (three castrated) and 22 (59.5%) were females (eight spayed). In the iAKI-Other group, there were 13 mixed breed, two Rottweilers, two Poodles, two Segugio Italianos, two Pinschers, and 16 other breeds. Median length of hospital stay was 6 days (range, 1–20) for the iAKI-Lepto group and 5 days (range, 1–14) for the iAKI-Other group. Among dogs in the iAKI-Lepto group, 21 (55%) survived, and 17 (45%) did not. In the iAKIOther group, 18 (49%) dogs survived, and 19 (51%) did not. Age was not different between groups ( $P = 0.65$ ), but bodyweight was significantly higher in the iAKI-Lepto group than the iAKI-Other group ( $P = 0.034$ ); there were more males (including castrated) in the iAKI-Lepto group than in the iAKI-Other group ( $P = 0.038$ ). Duration of hospital stay and survival frequency were not different between groups ( $P = 0.79$  and  $P = 0.07$ , respectively). Major clinical and clinicopathological findings detected in the study populations are reported in Table 2. Dogs in the iAKI-Lepto group had significantly higher sCr, IRIS AKI grade, serum total bilirubin and alanine transaminase concentrations than those in the iAKI-Other group. Dogs in the iAKI-Lepto group had significantly increased FEK than those in the iAKI-Other group ( $P = 0.048$ ; Table 2; Fig. 1). In addition, both the magnitude (uGlu: uCr) and the frequency of dipstick glucosuria (positive reaction) were significantly higher in the iAKI-Lepto group than the iAKIOther group (0.64, 0–26 vs. 0.22, 0–13,  $P = 0.023$  and 59% vs. 18%,  $P = 0.002$ , respectively; Table 2; Figs. 2 and 3). Frequency and severity of granular cast detection were not

statistically different between the iAKI-Lepto group and the iAKI-Other group ( $P = 0.2$  and  $P = 0.4$ , respectively; Table 2; Fig. 4). Urinary NGAL did not differ between groups when evaluated both as uNGAL or uNGAL: uCr ( $P = 0.18$  and  $P = 0.86$ , respectively; Table 2). According to the ROC curve analysis, FEK had 71.9% Se and 56.7% Sp (OCV > 77%; AUC = 0.646, 95% CI = 0.514–0.763;  $P = 0.04$ ); uGlu:uCr had 64% Se and 80.8% Sp (OCV > 0.34; AUC = 0.685, 95% CI = 0.540–0.808;  $P = 0.02$ ); and dipstick glucosuria had 59.4% Se and 82.1% Sp.

Table 1. Diagnostic test results for the diagnosis of leptospirosis in *I-AKI Lepto* dogs.

Diagnostic test	Sample	n (%)	Serogroup n (%)	n (%)	Antibody titre			
					1:6400	1:3200	1:1600	1:800
MAT (admission)	Serum	24/38 (63)	Australis	23/24 (96)	7/23	7/23	5/23	4/23
			Icterohaemorrhagiae	5/24 (21)			3/5	2/5
			Gryppotyphosa	5/24 (21)		1/5	3/5	1/5
			Pomona	1/24 (4)				1/1
MAT (convalescent)	Serum	15/38 (39)	Australis	15/15 (100)	7/15	4/15	3/15	1/15
			Gryppotyphosa	9/15 (60)	1/9	2/9	5/9	1/9
			Pomona	2/15 (13)				2/2
qPCR	Blood/urine	9/38 (24)						
ICT rapid test	Serum	30/38 (79)						

MAT, microagglutination test; qPCR, real-time PCR; n, number of positive dogs to the test, ICT, immunochromatographic; |

Table 2. Results of clinical and clinicopathological evaluation and their comparison between iAKI-Lepto and iAKI-Other groups.

Variable	<i>iAKI-Lepto</i> (n=38)	<i>iAKI-Other</i> (n=37)	Reference Interval	P value
<i>Clinical variables</i>				
AKI IRIS grading	4 (2-5)	3 (1-5)	/	.005
UO (mL/kg/h)	0.99 (0-3.50)	1 (0-13)	/	.2
<i>Haematology</i>				
HCT (%)	40±10	43±12	37-55	.24
WBC (/mm <sup>3</sup> )	21080 (8830-76410)	13835 (3140-79730)	6000-17000	.003
Neutrophils	16380 (7280-68740)	10460 (2330-69390)	3000-12000	.005
Monocytes	1280 (470-4910)	763 (173-3986)	100-1400	.003
Lymphocytes	1830 (570-4298)	1029 (346-9060)	1000-4800	.009
Platelets (/mm <sup>3</sup> )	169280±104152	305382±194182	160000-500000	.002
<i>Serum Chemistry</i>				
Glucose (mg/dL)	107±25	117±34	65-115	.59
Potassium (mEq/L)	3.9 (2.5-7.6)	4.5 (2.8-7.8)	3.8-5	.11
Sodium (mEq/L)	141±6	142 (114-158)	143-151	.57
Chloride (mEq/L)	107 (72-119)	99±15	108-118	.19
Total calcium (mg/dL)	9.6 (5.5-12.6)	9.5±1.3	9.0-11.8	.71
Ionised calcium (mmol/L)	1.10 (0.50-1.30)	1.16 (0.60-1.33)	1.22-1.35	.46
Phosphorus (mg/dL)	15.4±8.1	11.1 (3.1-36.4)	2.6-4.9	.33
Magnesium (mg/dL)	3.3±0.9	3.1±1.0	1.6-3.2	.24
Creatinine (mg/dL)	7.17 (1.99-28.70)	4.19 (1.41-21.39)	0.75-1.40	.006
Urea (mg/dL)	320 (61-729)	211 (30-784)	17-48	.02
Total protein (g/dL)	6.34±1.07	6.36±1.59	5.60-7.30	.84
Albumin (g/dL)	2.64±0.48	2.77 ±0.76	2.75-3.85	.19
Albumin:Globulin	0.715 (0.420-1.160)	0.855 (0.210-1.37)	0.75-1.35	.03
ALT (U/L)	185 (4-12410)	75 (15-4120)	15-65	.01
Total Bilirubin (mg/dL)	0.85 (0.18-36.17)	0.30 (0.01-10,17)	0.07-0.34	.0001
<i>Urinalysis and urine chemistry</i>				
USG	1014 (1008-1040)	1014 (1008-1050)	<1030	.96
pH	5.5 (5-7)	6 (-9)	/	.17
Dipstick glucose (mg/dL)	50 (0-300)	0 (0-300)	Absent	.002
Granular casts (+/LPF)	2 (0-3)	2 (0-3)	Absent	.2
UPC	2.14 (0.40-184)	2.38 (0.09-72)	0-0.5	.85
uCr (mg/dL)	76 (12-422)	67 (8-307)	44-563	.92
uCr:sCr (mg:mg)	12 (0-87)	12 (0-218)	37-547	.46
uGlu:uCr (mg:mg)	0.64 (0-26)	0.22 (0-13)	0-0.6	.023
FEK (%)	100 (20-480)	68 (5-300)	2.3-23.8	.048
FENa (%)	2.70 (0.20-18)	1.80 (0.04-69)	0-0.69	.37
FECI (%)	3.70 (0.20-83)	1.90 (0.06-66)	0-1.09	.14
FECa (%)	4.2 (0.6-70)	3.9 (0.1-56)	0-0.33	.31
FEP (%)	33 (14-125)	37±27)	2.2-27.2	.21
FEMg (%)	11 (3-141)	8 (1-81)	0-4	.29
uNGAL (pg/mL)	156038±99276	35920 (637-1241800)	0-2600	.18
uNGAL:uCr (pg:mg)	238862±220938	69770 (511-3873232)	0-1200	.86

UO, Urine output; HCT, Haematocrit value; WBC, White blood cell count; Albumin:Globulin, Albumin to globulin ratio; ALT, alanine transaminase; USG, Urine specific gravity; LPF, Low power field; UPC, Urine protein to creatinine ratio; uCr, Urine creatinine; uCr:sCr, urine

creatinine to serum creatinine ratio; uGlu, Urine glucose; uGlu:uCr, Urine glucose to creatinine ratio; FEK , Fractional excretion of potassium; FENa, Fractional excretion of sodium; FECl, Fractional excretion of chloride; FECa, Fractional excretion of calcium; FEP, Fractional excretion of phosphate; FEMg Fractional excretion of magnesium; uNGAL, Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin; uNGAL:uCr, Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin to creatinine ratio. Numerical data are reported as mean±standard deviation or median and range (minimum-maximum value) based on their distribution. (OCV = positive glucose reaction; AUC = 0.708, 95% CI = 0.595– 0.820; P = 0.0003) to correctly differentiate dogs in the iAKILepto group from those in the iAKI-Other group. Multivariate binary logistic regression analysis was performed with sCr, FEK and dipstick glucosuria as independent variables to correctly identify dogs to be assigned to the iAKI-Lepto group. Positive dipstick glucosuria was the only variable retained by the model that correctly predicted occurrence of leptospirosis (P =0.003), with an OR of 6.2 (95% CI, 1.8–21.1).

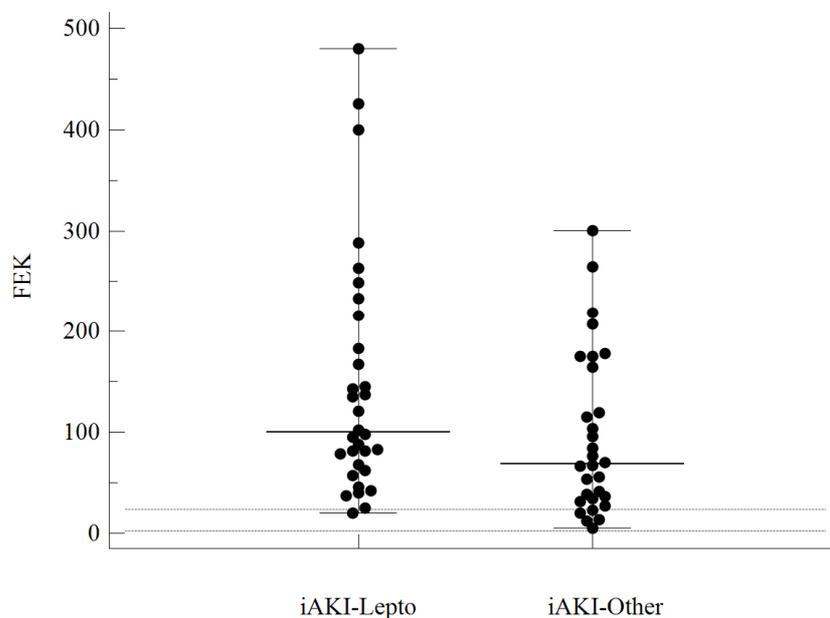


Fig. 1. Dot plot showing results of fractional excretion of potassium (FEK) in dogs with intrinsic acute kidney injury and leptospirosis (iAKI-Lepto; n = 38) and dogs with intrinsic acute kidney

injury of different aetiology (iAKI-Others; n = 37). Results were significantly different between groups (P = 0.048). Thin bars represent minimum and maximum values, while the central horizontal line indicates median value. Horizontal dotted lines represent upper and lower limits of the reference interval.

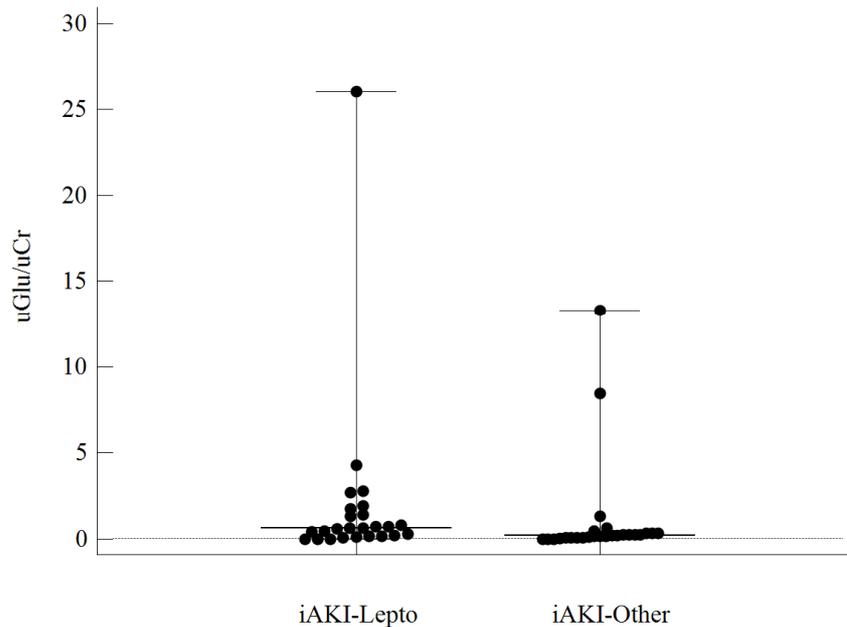


Fig. 2. Dot plot showing results of urine glucose to creatinine ratio (uGlu:uCr) in dogs with intrinsic acute kidney injury and leptospirosis (iAKI-Lepto; n = 38) and dogs with intrinsic acute kidney injury of different aetiology (iAKI-Others; n = 37). Results were significantly different between groups (P = 0.023). Thin bars represent minimum and maximum values, while the central horizontal line indicates median value. Horizontal dotted line represents the upper limit of the reference interval.

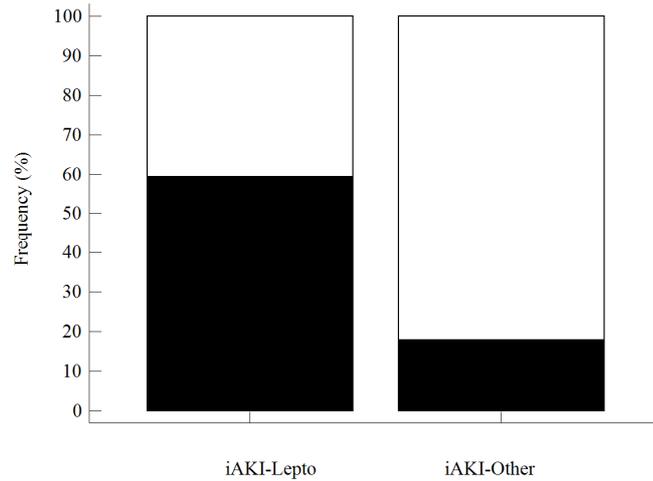


Fig. 3. Frequency of dipstick glucosuria in dogs with intrinsic acute kidney injury and leptospirosis (iAKI-Lepto; n = 38) and dogs with intrinsic acute kidney injury of different aetiology (iAKI-Others; n = 37). Results were significantly different between groups (P = 0.002). Black boxes represent the percentage of positive results.

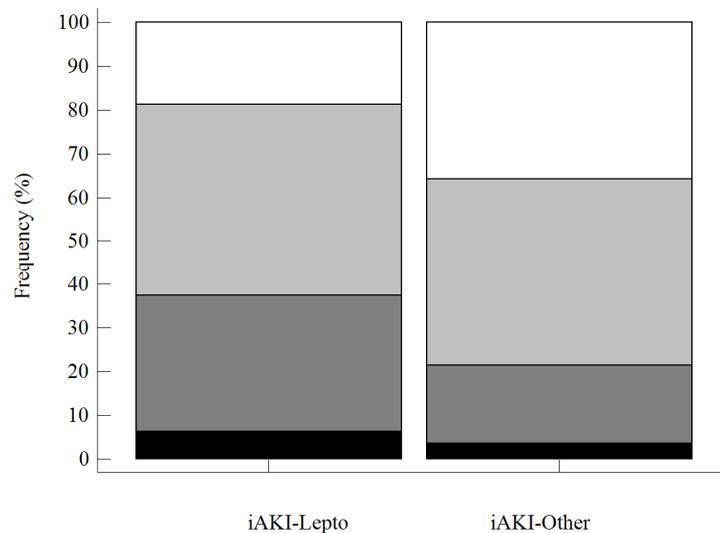


Fig. 4. Frequency and severity of cylindruria (granular casts in the urine sediment) in dogs with intrinsic acute kidney injury and leptospirosis (iAKI-Lepto; n = 38) and dogs with intrinsic acute kidney injury of different aetiology (iAKI-Others; n = 37). Results were not different between groups (P = 0.2). Severity of cylindruria was graded as number of granular casts at low-power Field (LPF) as follows: >2 LPF, light grey box; >6 LPF, dark grey box; >10 LPF, black box.

## Discussion

Proximal tubular damage is the most prevalent form of renal injury in human leptospirosis, as demonstrated by normoglycaemic glucosuria, hyperphosphaturia and bicarbonate loss (Seguro et al., 1990; Magaldi et al., 1992; Liamis et al., 2000; Wu et al., 2004; Khositseth et al., 2008). Inappropriate kaliuresis leading to hypokalaemia occurs in 20–45% of people with leptospirosis (Abdulkader et al., 1996; Liamis et al., 2000; Khositseth et al., 2008), while hyperuricosuria and excessive urinary magnesium wasting causing hypomagnesaemia have been reported less frequently (Visith and Karkiat, 2005; Khositseth et al., 2008). In veterinary medicine, leptospirosis has been inconsistently associated with serum electrolyte depletion (Navarro et al., 1981; Knöpfler et al., 2017). However, studies evaluating the pattern of urinary electrolytes during the disease are lacking. A case report documenting severe symptomatic hypokalaemia requiring mechanical ventilation attributed to severe kaliuresis (FEK, 31%) in a dog with leptospirosis was recently published (Allen et al., 2016); this was, however, an unusual presentation for canine leptospirosis (Allen et al., 2016). Increased urinary potassium excretion in the iAKI-Lepto group might reflect similar molecular mechanisms investigated in human and animal models of the disease, such as Na-K ATPase inhibition, increased plasma aldosterone and cortisol concentration, and impairment of Na-K-Cl co-transport in the thick ascending limb of the Loop of Henle (Abdulkader et al., 1996; Visith and Karkiat, 2005; Khositseth et al., 2008). Of note, dogs in the iAKI-Lepto group in our study also had higher sCr and IRIS grade than dogs in the iAKI-Other group. Hence, the higher kaliuresis documented here might reflect the presence of a more severe tubular impairment in dogs with leptospirosis. However, there were no differences in additional urinary markers of tubular damage, including urinary NGAL and granular casts in the urine sediment, suggesting that AKI severity is not the only reason for elevated kaliuresis in the iAKI-Lepto group. Another unexpected finding in iAKI-Lepto group compared to the iAKI-Other group was the significantly greater magnitude and frequency of

glucosuria. Positive dipstick glucosuria correctly predicted the occurrence of leptospirosis in our population in multivariate binary logistic regression analysis. Comparable serum glucose concentrations between groups further corroborates the possibility of inappropriate renal glucose wasting during canine leptospiral infection. Mild to moderate normoglycaemic glucosuria is a well-known feature of acute tubular damage and has been reported in dogs with AKI of various aetiologies including leptospirosis (Ross, 2011; Schuller et al., 2015). Comparisons of the occurrence and severity of glucosuria have not been previously addressed in canine leptospirosis and should be confirmed in larger studies. It is possible that there is a link between the pathophysiology of renal potassium and glucose wasting in dogs with leptospirosis. Most of the filtered potassium is reabsorbed in the proximal convoluted tubule and in the thick ascending limb of the Loop of Henle; thereafter, approximately 10% of the filtered load reaches the distal tubule, where it is secreted into the lumen for final excretion (DiBartola, 2012; Bailey et al., 2015). Similarly, almost all filtered glucose is reabsorbed in the proximal tubule (65–70%) and in the ascending limb of Henle (10–20%), but the role of the distal nephron in renal glucose handling remains unclear (Mather and Pollok, 2011). This suggests selective damage to the proximal tubular segments involved in potassium and glucose reabsorption in canine leptospirosis. Glomerular hyperfiltration, increasing distal tubular flow and enhancing potassium and glucose concentration at the distal tubule level, as demonstrated in other conditions (e.g., human pregnancy; Mather and Pollok, 2011; DiBartola, 2012), is less likely, considering the pathogenesis of leptospiral AKI, but cannot completely be ruled out. However, due to the lack of additional markers to localise tubular damage in our study population, no further conclusions regarding the pathogenesis of increased kaliuresis and glucosuria during canine leptospirosis can be drawn. According to the ROC curve analysis, the accuracy of both kaliuresis and glucosuria (uGlu:uCr) to discriminate between the iAKI-Lepto and iAKI-Other groups was weak; hence, clinicians in practice cannot rely on these findings

when estimating the likelihood of leptospirosis in an individual dog. Nevertheless, based on our results, renal glucosuria in a dog with AKI could increase the suspicion of leptospirosis. Despite the growing interest in the clinical utility of NGAL in dogs with AKI, to the best of the author's knowledge, data regarding NGAL concentrations during canine leptospirosis are not available. Both circulating and urinary NGAL values can increase during inflammatory and septic states in dogs, challenging its specificity to diagnose and prognosticate AKI in such settings (Cortellini et al., 2015; Monari et al., 2020). In the present study, white blood cell count was significantly higher in the iAKI-Lepto group than the iAKI-Other group, but serum CRP concentrations were similar in both groups. Indeed, multiple inflammatory or septic conditions were diagnosed in the iAKI-Other group. Urinary NGAL was significantly increased in all dogs with AKI in our study, but did not differ between the iAKI-Lepto and iAKI-Other groups. Hence, urinary NGAL was not a predictor of leptospirosis over other possible AKI aetiologies. Some limitations should be acknowledged when interpreting our results. Because of the intrinsic limitations in the diagnosis of canine leptospirosis (Schuller et al., 2015), dogs with false-negative leptospirosis results might have been assigned to the iAKI-Other group. However, all dogs in this group were diagnosed with a nonleptospiral disease that could plausibly have caused iAKI, reducing the potential for a missed diagnosis of leptospirosis. Our decision to exclude dogs with iAKI of unknown aetiology (as they did not fit in the iAKI-Lepto or in iAKI-Other groups) aimed to increase the accuracy of our inclusion criteria and the value of the comparisons performed. This approach, however, could make the study less generalisable to clinical settings where iAKI without an identified underlying disease are sometimes managed. Furthermore, urine chemistry was only assessed at the time of presentation; the development of specific features of tubular damage or unexpected urinary electrolyte wasting might have occurred later during the course of disease, and might not have been recognised. Finally, no histopathological data were available to assess the severity of AKI and the degree of tubular damage.

## **Conclusions**

Dogs with intrinsic AKI due to leptospirosis had increased glucosuria and kaliuresis compared to other causes of iAKI, probably due to the type of renal tubular damage. The diagnostic potential of these abnormalities, however, is only fair, and specific serologic and molecular diagnostic tests are required to confirm the infection.

## **Conflicts of interest**

None of the authors has financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

## **Acknowledgements**

Preliminary results of the study were presented at the 28<sup>th</sup> ECVIM-CA annual congress, Rotterdam, The Netherlands, September 6-8th 2018

## **References**

1. Abdulkader, R. C., Seguro, A. C., Malheiro, P. S., et al. (1996) Peculiar electrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to acute leptospirosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 1-6
2. Acierno, M. J., Brown, S., Coleman, A. E., et al. (2018) ACVIM consensus statement: guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32, 1803-1822
3. Allen, A. E., Buckley, G. J., Schaer, M. (2016) Successful treatment of severe hypokalemia in a dog with acute kidney injury caused by leptospirosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 26, 837-843

4. Bailey, M. A., Shirley, D. G., Unwin R.J. (2015) Renal Physiology In: Comprehensive Clinical Nephrology. 4th edn. Eds R. J. Johnson, J. Feehally, J. Floege. Elsevier Saunders, Philadelphia. pp 14-29
5. Brown, N., Segev, G., Francey, T., et al. (2015) Glomerular filtration rate, urine production and fractional clearance of electrolytes in acute kidney injury in dogs and their association with survival. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29, 28–34
6. Cortellini, S., Pelligand, L., Syme, H., et al. (2015) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in dogs with sepsis undergoing emergency laparotomy: a prospective case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29, 1595-1602
7. Daher Ede, F., Zanetta, D. M., Abdulkader, R. C. (2004) Pattern of renal function recovery after leptospirosis acute renal failure. *Nephron Clinical Practice* 98, 8-14
8. De Brito, T., Menezes, L. F., Lima, D. M., et al. (2006) Immunohistochemical and in situ hybridization studies of the liver and kidney in human leptospirosis. *Virchows Archive: European Journal of Pathology* 448, 575-583
9. DiBartola, S. P. (2012) Disorders of Potassium: Hypokalemia and HyperKalemia In: *Fluid, Electrolyte and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice*. 4th edn. Eds Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri. pp 92-119
10. Gentilini, F., Mancini, D., Dondi, F., et al. (2005) Validation of a immunoturbidimetric assay for measuring canine C-reactive protein. *Veterinary Clinical Pathology supplement* 318, 34.
11. International Renal Interest Society (IRIS). (2013) Guidelines: IRIS grading of acite kidney injury. <http://www.iris-kidney.com/guidelines/grading.html>. Accessed August 19, 2019

12. Kellum, J. A., Lameire, N. (2013) KIDIGO AKI Guideline Work Group. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KIDIGO summary (Part 1). *Critical Care* 17, 204
13. Kellum, J. A., Sileanu, F. E., Murugan, R., et al. (2015) Classifying AKI by urine output versus serum creatinine level. *Journal of the American Society of Nephrology* 26, 2231–2238
14. Khositseth, S., Sudjaritjan, N., Tananchai, P., et al. (2008). Renal magnesium wasting and tubular dysfunction in leptospirosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 23, 952-958
15. Knöpfler, S., Mayer-Scholl, A., Luge, E., et al. (2017) Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *Journal of Small Animal Practice* 58, 582-588
16. Liamis, G., Rizos, E., Elisaf, M. S. (2000) Reversible proximal tubular dysfunction in a patient with acute febrile illness and normal renal function: an evidence towards leptospirosis. *Clinical Nephrology* 53, 316
17. Magaldi, A. J., Yasuda, P. N., Kudo, L. H., et al. (1992). Renal involvement in leptospirosis: a pathophysiologic study. *Nephron* 62, 332-339
18. Makris, K., Spanou, L. (2016) Acute kidney injury: diagnostic approaches and controversies. *The Clinical Biochemist Reviews* 37:153–175
19. Mastrorilli, C., Dondi, F., Agnoli, C., et al. (2007) Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans Australis* serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 3-10
20. Mather, A., Pollock, C. (2011) Glucose handling by the kidney. *Kidney International* 79, S1–S6; doi:10.1038/ki.2010.509

21. Monari, E. Monari, E., Troia, R., Magna, L., Gruarin, M., Grisetti, C., Fernandez, M., Balboni, A., Giunti, M., Dondi, F., 2020. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin to diagnose and characterize Acute Kidney Injury in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 34, 176–185.
22. Nally, J. E., Chantranuwat, C., Wu, X. Y., et al. (2004) Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary haemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *The American Journal of Pathology* 164, 1115-1127
23. Navarro, C. E., Kociba, G. J., Kowalski, J. J. (1981) Serum biochemical changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection. *American Journal of Veterinary Research* 42, 1125-1129
24. Ross, L. (2011) Acute Kidney Injury in dogs and cats. *Veterinary clinics of North America Small Animal practice* 41, 1-14
25. Sanches, R., Santos, P. M., Seguro, A. C., et al. (2009) NKCC2 and AQP2 protein expression is upregulated in the recovery phase of leptospirosis-induced acute kidney injury (AKI). *Journal of the American Society of Nephrology* 20, 362A
26. Schuller, S., Francey, T., Hartmann, K., et al. (2015) European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 56, 159-179
27. Segev, G., Daminet, S., Meyer, E., et al. (2015) Characterization of kidney damage using several renal biomarkers in dogs with naturally occurring heatstroke. *Veterinary Journal* 206, 231–235
28. Seguro, A. C., Lomar, A. V., Rocha, A. S. (1990) Acute renal failure of leptospirosis: non-oliguric and hypokalemic forms. *Nephron* 55, 146-151

29. Troia, R., Gruarin, M., Grisetti, C., et al. (2018a) Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: Diagnostic and prognostic implications. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32, 1372-1382
30. Troia, R., Balboni, A., Zamagni, S., et al. (2018b) Prospective evaluation of rapid point-of-care tests for the diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Veterinary Journal* 237, 37-42
31. Visith, S, Kearkiat, P. (2005) Nephropathy in leptospirosis. *Journal of Postgraduated Medicine* 51, 184-188.
32. Vitorio, D., Maciel, A. T. (2014) Acute kidney injury induced by systemic inflammatory response syndrome is an avid and persistent sodium retaining state. *Case Report in Critical Care* 2014, 471658
33. Wu, M. S., Yang, C. W., Pan, M. J., et al. (2004). Reduced renal Na-K-Cl cotransporter activity and inhibited NKCC2 mRNA expression by *Leptospira shermani*: from bed-side to bench. *Nephrology Dialysis Transplantation* 19, 2472-2479

### **3. PROSPETTIVE PER STUDI FUTURI SULLA LEPTOSPIROSI ED IL DANNO RENALE**

La leptospirosi ha affinità per le cellule tubulari renali e la membrana basale tubulare. Studi sperimentali hanno dimostrato una riduzione del riassorbimento di sodio e quindi acqua nel tubulo prossimale a causa della ridotta espressione di Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> pompa di scambio sulla membrana apicale. Inoltre, l'infezione da leptospirosi è associata a resistenza all'ormone antidiuretico e ridotta espressione dell'acquaporina-2 nel dotto collettore, riducendo ulteriormente il riassorbimento dell'acqua (Andrade et al.;2007. Seguro et al.; 2013). Inoltre l'iperpotassiemia può essere causata dalla poliuria e polidipsia, risultanti da una ridotta reattività all'ormone antidiuretico e ridotta attività dell'acquaporina-2 nelle membrane luminali delle cellule epiteliali renali dei dotti collettori nella corteccia e nella midollare.

Tra le alterazioni elettrolitiche è stata descritta anche ipomagnesiemia che potrebbe aver contribuito alla diminuzione del potassio renale, perché il magnesio intracellulare è un determinante importante per la secrezione di potassio nel nefrone distale (Huang et al.;2007)

Nelle persone, l'ipomagnesiemia è stata segnalata nel 50% di pazienti con AKI indotto da leptospirosi (Seguro et al.; 2015)

È descritto in letteratura un caso compatibile con un iperaldosteronismo secondario, caratterizzato sia da alti livelli di renina plasmatica che di alti livelli di aldosterone, probabilmente correlati all'AKI causato da infezione da leptospirosi, che è stata ben descritta in medicina umana (Abdulkader et al.;1996 Allen et al 2016). L'aldosterone stimola la secrezione di potassio nel tubulo distale e nel collettore attraverso il meccanismo sopra descritto. Nello studio di Allen et al, il cane, in presentazione iniziale, si presentava ipovolemico e disidratato e con AKI, tutti trigger che attivano il sistema renina-angiotensina-aldosterone con l'obiettivo netto di preservare il sodio e quindi acqua per mantenere il volume intravascolare; purtroppo,

non è stato misurato il livello di attività della renina. Nelle persone, è stato riportato che le concentrazioni di aldosterone si normalizza in 4-7 giorni dopo il trattamento per AKI indotto da leptospirosi (Abdulkader et al.;1996). Non ci sono studi in medicina veterinaria che documentano le concentrazioni di aldosterone in cani a fini comparativi, per cui sarebbe molto interessante mettere a punto la metodica validata, per la misurazione dell'aldosterone canino e fare queste valutazioni per comprendere meglio il fenomeno della kaliuresi, documentata anche nel nostro studio. Nel caso descritto da Allen et al, viene riportato che il cane, 3 settimane dopo la terapia ha una concentrazione di aldosterone ancora aumentata, la frazione escreta di potassio aumentata e come anche l'attività della renina plasmatica, che è coerente con l'iperaldosteronismo secondario.

Non è chiaro il motivo per cui l'attività della renina di questo cane e le concentrazioni di aldosterone sono rimaste costantemente elevate di fronte al miglioramento della funzionalità renale (Allen et al 2016).

L'ischemia renale in corso potrebbe spiegare l'attivazione della renina-angiotensina-aldosterone, anche se sarebbe sorprendente vedere la risoluzione dell'iperazotemia se questo fosse il caso. I proprietari del cane riportato nel case report di Allen et al, hanno riferito un livello di sete normale al momento del riesame; è possibile che il cane sia rimasto in qualche modo polidipsico senza che proprietari lo abbiano notato, situazione in cui giustificherebbe una lieve ipovolemia e quindi attivazione renina-angiotensina-aldosterone.

Magaldi et al hanno riscontrato che, nelle cavie infette da leptospirosi, le alterazioni funzionali nelle cellule tubulari precedono un calo della velocità di filtrazione glomerulare. Gli stessi autori hanno dimostrato anche l'incapacità del rene di concentrare l'urina in studi in cui hanno indotto la leptospirosi, il fallimento è dovuto, almeno in parte, alla resistenza alla vasopressina del midollare interna (Magaldi et al.;1992). Anche in questo caso sarebbe molto interessante mettere

a punto una metodica di laboratorio per documentare questi aspetti fisiopatologici nel cane, proprio per le analogie riscontrate con la letteratura umana nel nostro lavoro sulle frazioni di escrezione.

Anche la frazione di escrezione del magnesio, merita approfondimenti nella leptospirosi, in quanto, in letteratura è riportato che la supplementazione di magnesio è consigliata in casi di ipokaliemia refrattaria perché adeguati livelli di magnesio intracellulare sono necessari per prevenire la perdita renale di potassio (Huang et al.;2007; Unwin et al.; 2011). Il magnesio è necessario per il corretto funzionamento della pompa Na-K-ATPasi sulla membrana cellulare e, soprattutto, ancora di più per i canali ROMK sulla membrana cellulare tubulare apicale. Privata di un adeguato apporto intracellulare di magnesio, la pompa Na-K-ATPasi diventa così meno efficiente per cui si assiste ad una diminuzione dell'assorbimento intracellulare di potassio. Se ciò si verifica contemporaneamente ad una maggiore escrezione urinaria di potassio, può verificarsi ipokaliemia.

#### **4. FOCUS SULLA SINDROME CARDIO RENALE, DANNO TUBULARE E UTILITA' DELLA CHIMICA URINARIA**

##### **I.FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME CARDIO RENALE**

Il cuore ed il rene funzionano insieme per regolare l'omeostasi circolatoria attraverso diversi meccanismi e circuiti di feedback. Negli individui sani, la filtrazione glomerulare rimane stabile nonostante le variazioni di volume e pressione sanguigna. In presenza di sovraccarico di volume o ipernatremia, vi è un aumento della pressione atriale e il rilascio di peptidi natriuretici, per facilitare l'escrezione renale di sodio attraverso il tubulo, contestualmente ad un aumento della velocità di filtrazione glomerulare (Harris et al.;1987; Cadnapaphornchai, et al 2001.).

L'inibizione concomitante del sistema renina angiotensina– aldosterone (RAAS) (figura 3.1) contribuisce alla stabilità della pressione tramite vasodilatazione sistemica ed escrezione sodio renale inibendo gli effetti tubulari dell'angiotensina II e dell'aldosterone (Guyton, 2006). Al contrario, in un paziente volume-depleto, il RAAS contribuisce al mantenimento della pressione sanguigna e alla conservazione del sodio renale.

Inoltre, l'angiotensina II induce vasocostrizione efferente, che aiuta a mantenere la pressione di filtrazione renale e la velocità di filtrazione nonostante la diminuzione della pressione arteriosa (Schrier, et al.;1999).

L'Attivazione del sistema nervoso simpatico ha un effetto simile ed è in parte stimolato dal RAAS. Inoltre, l'interazione del sistema cardiorenale influisce sull'osmoregolazione attraverso effetti sulla diuresi dell'acqua. In normali condizioni fisiologiche, il rilascio di vasopressina (un

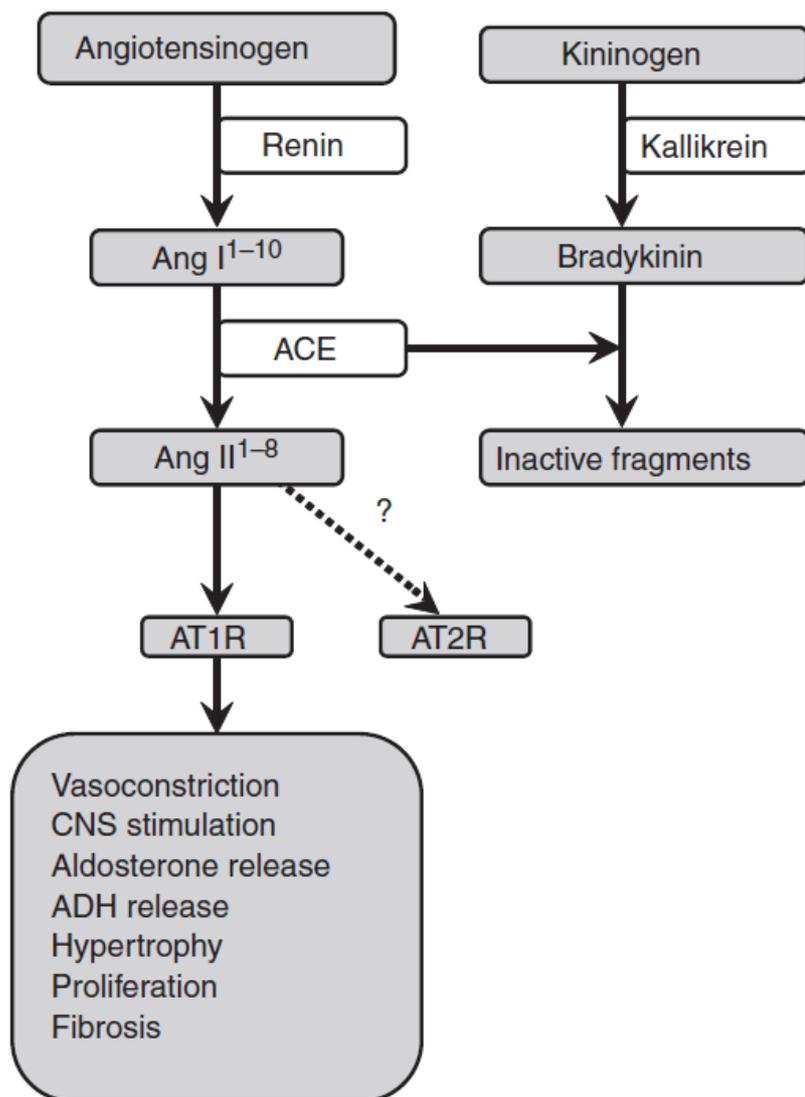
ormone antidiuretico) è stimolato da un'elevata osmolarità plasmatica, che porta a ritenzione idrica a livello renale e ripristina la normale osmolarità (Baylis, et al;1987).

Tuttavia, durante importanti variazioni di volemia, le risposte fisiologiche alla deplezione o al sovraccarico di volume, possono sovrastare i fattori scatenanti definiti come “trigger osmotici”, contribuendo al ripristino della volemia a scapito dell'osmo-regolazione (Guyton 2006).

Nei pazienti con insufficienza cardiaca acuta, una diminuzione della frequenza cardiaca, provoca una riduzione della gittata, un riempimento non adeguato delle arterie, con conseguente diminuzione dell'attivazione dei recettori di “stretch” e vasocostrizione sistemica e intra-renale compensatoria (Schrier, et al.;1999).

A livello dell'arteriola afferente glomerulare vi è lo stimolo per il rilascio di renina, che porta alla produzione di angiotensina II, il cui il rilascio porta a vasocostrizione afferente ed efferente, stimolazione della ritenzione di sodio nel tubulo prossimale, e rilascio di aldosterone (Unger et al.;2004)

A sua volta, l'aldosterone aumenta riassorbimento di sodio nel dotto collettore, con conseguente espansione di fluidi nel comparto extracellulare e congestione sistemica. In individui sani, un apporto di sodio al tubulo distale conseguente all'aumento del volume vascolare, sovrasta l'effetto di ritenzione del sodio dell'aldosterone (noto come meccanismo di fuga dell'aldosterone). (Weber, et al.;2001) Questo meccanismo è compromesso nei pazienti con insufficienza cardiaca acuta, nei quali, in risposta al ridotto flusso sanguigno renale, viene ritenuto il sodio, sotto lo stimolo dell'aldosterone.



**FIGURA 4.1** Una visione semplificata del sistema circolante renina-angiotensina "classico". Freccie intere indicano percorsi, il cui significato clinico è stato dimostrato. La freccia tratteggiata indica il percorso dedotto da esperimenti su colture animali o cellulari, non ancora definitivamente dimostrati clinicamente rilevanti. Da *Renin-angiotensin-aldosterone system blockade in high-risk hypertensive patients: current approaches and future trends* Gullapalli et al *Ther Adv Cardiovasc Dis* (2010) 4(6) 359-373

Anche l'insufficienza cardiaca risulta mediata dai barocettori, con attivazione del sistema nervoso simpatico che promuove vasocostrizione e contribuisce all'ulteriore attivazione di RAAS e alla ritenzione renale di sodio e acqua. Il rilascio di ormone antidiuretico esacerba questi effetti (Schrier et al.;1979). Inoltre, l'effetto protettivo dei peptidi natriuretici è diminuito nei pazienti con insufficienza cardiaca acuta a causa della vasocostrizione renale, ridotto rilascio

di sodio, sono presenti meno forme attive di peptide natriuretico e vi è una downregulation dei loro recettori (Charloux, et al.;2003. Liang, et al.; 2007). Inoltre, l'adenosina (rilasciata in risposta all'aumento del lavoro renale e all'alta concentrazione di sodio nel tubulo distale) riduce ulteriormente il flusso ematico renale (renal blood flow, RBF), stimola il riassorbimento prossimale di sodio e attraverso il feedback tubulo-glomerulare diminuisce ulteriormente il GFR tramite il recettore per l'adenosina A1 (Vallon et al.;2008).

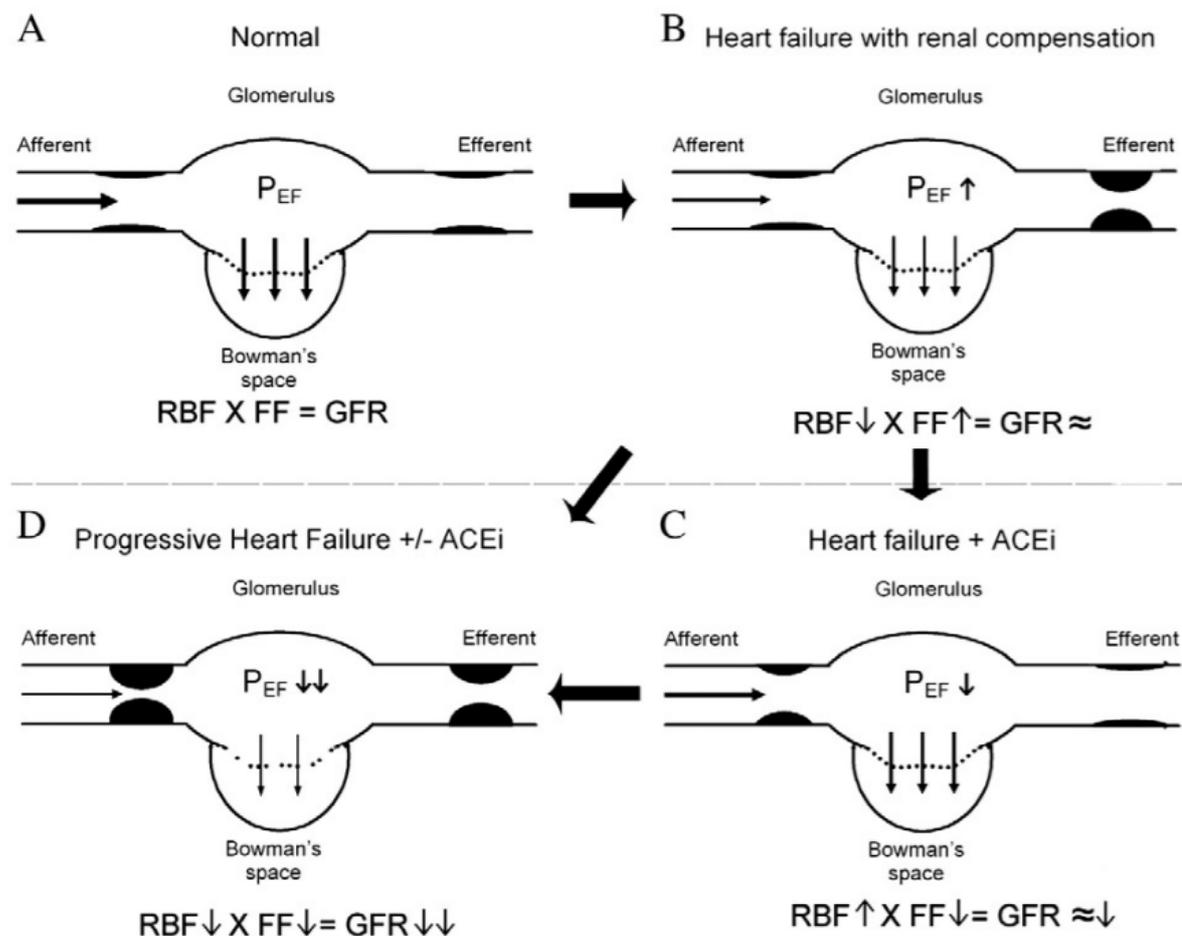
In contrasto con il recettore dell'adenosina A1, l'attivazione del recettore dell'adenosina A2 può aumentare la secrezione di renina (Vallon et al.; 2008). La combinazione di questi percorsi crea un circolo vizioso che porta a ulteriore congestione e peggioramento dell'insufficienza cardiaca.

Uno dei principali sintomi dell'insufficienza cardiaca è la diminuzione della perfusione d'organo. Il rene può compensare un calo del flusso sanguigno renale aumentando la frazione di filtrazione tramite la vasocostrizione efferente mediata dall'angiotensina II e preservando così la GFR (Damman et al.;2011).

La combinazione di deficit della pompa cardiaca, attivazione neuro-ormonale e terapie per l'insufficienza cardiaca, in particolare inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina e bloccanti del recettore dell'angiotensina, possono sovrastare la capacità del rene di compensare la ridotta perfusione (Hillege et al.;2000; Smilde et al.;2009).

Inoltre, l'aumento del riempimento venoso e delle pressioni addominali dovute all'ascite può aumentare il post-carico renale e la pressione intra-renale, ridurre il gradiente di perfusione trans-renale (e quindi la pressione di perfusione renale), aumentare la pressione interstiziale renale (opponendosi direttamente alla pressione di filtrazione) e contribuire ulteriormente all'insufficienza renale (Damman, et al.;2007).

La figura 4.2 mostra la rappresentazione grafica dell'ipotetica progressione dell'insufficienza renale in caso di malattia cardiaca (HF) cronica e l'effetto della terapia con ACEi (e/o bloccante del recettore dell'angiotensina). Insieme, queste osservazioni nell'insufficienza cardiaca cronica suggeriscono che la conservazione della RBF è essenziale, per preservare il GFR. L'inibizione del sistema renina angiotensina aldosterone (RAAS) rimane la pietra angolare della protezione cardiorenale, ma in condizioni di RBF estremamente basso, rimane discutibile se l'inibizione del RAAS possa ancora migliorare GFR.



**FIGURA 4.2** Diminuzione della perfusione renale e progressione dell'insufficienza renale nello scompenso cardiaco. Abbreviazioni:  $P_{EF}$ , pressione glomerulare. FF frazione di filtrazione.

A, individuo normale.

B, In HF, RBF è diminuito a causa della diminuzione della gittata cardiaca. Per preservare la GFR, l'autoregolazione dell'arteriola efferente determina un aumento della vasocostrizione efferente. Questo si traduce in un aumento di  $P_{EF}$ , aumento di FF e GFR.

C stabile, viene iniziato ACEi. Gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina prendono di mira prevalentemente, vasocostrizione dell'efferente. Ciò si traduce in un RBF migliorato e un FF inferiore, mentre il GFR a lungo termine è stabile (nelle fasi iniziali, ACEi si tradurrà in una modesta diminuzione della GFR).

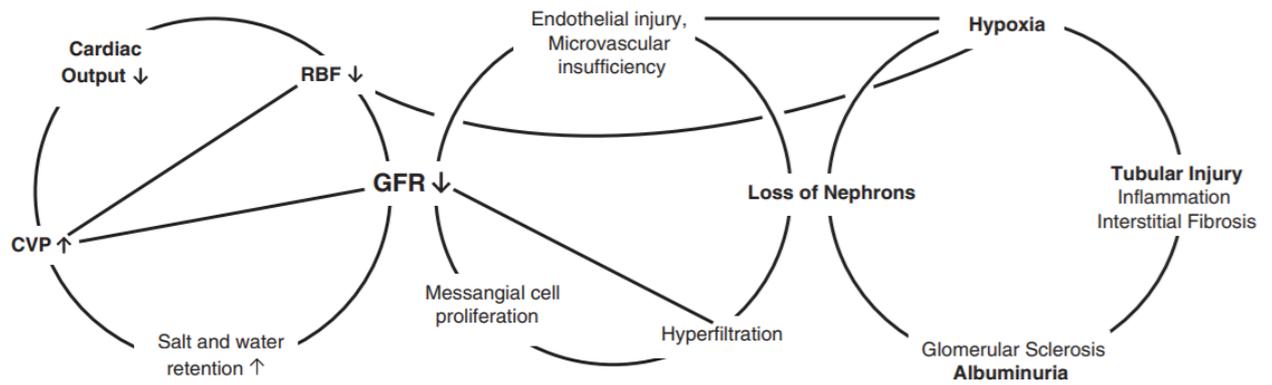
D, Con o senza ACEi, con progressione di HF, la GFR diminuirà ulteriormente. Ciò è dovuto all'aumento della vasocostrizione dell'afferente ed in assenza di ACEi, aumento della vasocostrizione efferente, con conseguente  $P_{EF}$  fortemente ridotto.

È possibile che con ACEi, l'incapacità del rene di aumentare adeguatamente la vasocostrizione efferente possa comportare, in alcuni casi ad un calo più rapido della GFR. Infine, in aggiunta, si verificheranno cambiamenti strutturali della membrana glomerulare con conseguente perdita di proteine. Da: Damman, K., Voors, A. A., Navis, G., van Veldhuisen, D. J. & Hillege, H. L. The cardiorenal syndrome in heart failure. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2011; 54, 144–153.

## II. IL DANNO TUBULARE NELLO SCOMPENSO CARDIACO

In analogia alla malattia renale, in cui entrambi hanno ridotto il GFR e l'albuminuria fanno parte della patologia della malattia, a un danno tubulo-interstiziale può sviluppare la sindrome cardiorenale. Possono essere responsabili diversi meccanismi per lo sviluppo di danno tubulo-interstiziale o tubulare, ma i più importanti sono probabilmente diminuzione della perfusione locale renale, aumento della congestione venosa e alto carico di albumina ai tubuli (Wegria et al.;1955; Damman K, et al.;2008; Damman et al.; 2009; Damman et al.;2010.). Diminuzione della perfusione renale a causa della ridotta gittata cardiaca, non solo alterano la GFR ma privano anche parti del tessuto renale dell'adeguato apporto di ossigeno. Anche in questo caso, nello scompenso cardiaco, il flusso di sangue nella corticale renale, è particolarmente diminuito, il che suggerisce che queste parti del rene sarebbero a rischio per lo sviluppo di danno tubulo-interstiziale (Leithe et al.; 1984; Eijkelkamp et al.;2007)

Una pressione venosa centrale (CVP) elevata indurrà un aumento pressione venosa renale ed elevata pressione interstiziale intra-renale. Questo è stato collegato allo sviluppo di infiammazione tubulare e fibrosi, che è lo stadio terminale del danno tubulo-interstiziale. Figura 4.3. Come suggerito, l'albuminuria può essere un marker specifico di lesione tubulare. Tuttavia, esistono nuovi e marker sensibili e specifici di danno tubulare e sono stati studiati non solo nella malattia renale ma anche nello scompenso cardiaco. (Bazzi et al.; 2002; van Timmeren et al.; 2007).



**FIGURA 4.3** *Schema integrato della sindrome cardio renale nello scompenso cardiaco. Da Damman et al.; The Cardiorenal Syndrome in Heart Failure. Progress in Cardiovascular Diseases 54 (2011) 144–153*

Questi marker tubulari sono proteine che sono sia espresse dalla membrana cellulare tubulare, sia secrete nelle urine o attivamente secrete nel lume tubulare in risposta alla lesione tubulare. Sebbene ampiamente studiate nelle malattie renali, il diretto ruolo fisiologico che queste proteine svolgono rimane ancora per certi aspetti, da chiarire. Tra i tanti, i marcatori meglio studiati finora nello scompenso cardiaco sono N-acetil-beta-D-glucosaminidasi (NAG) e per il rene la molecola di lesione 1 (KIM-1) e lipocalina associata a gelatinasi dei neutrofili (NGAL). In medicina umana esistono altri marcatori tubulari, attualmente in oggetto di studio nello scompenso cardiaco, ma non applicabili, al momento in medicina veterinaria. Sia NAG che KIM-1 sono rilevabili solo nelle urine, mentre NGAL può essere misurata nel siero e nelle urine. KIM-1 È importante sottolineare che sia durante lo scompenso cardiaco acuto, che in cronico, sono stati osservati aumentati i livelli di questi marker (Damman et al 2008; Bolignano et al.;2009; Damman et al 2010. Aghel et al.;2010)

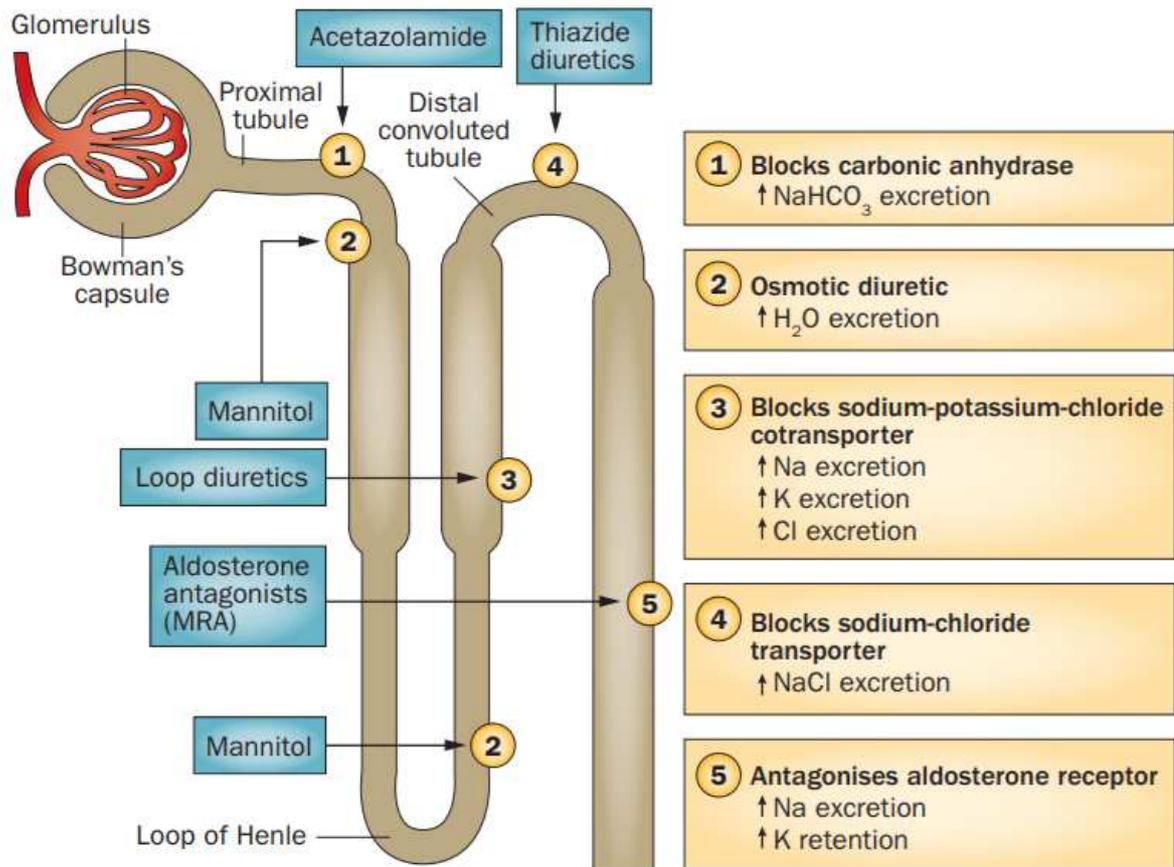
In letteratura, è stato dimostrato che le concentrazioni urinarie di questi 3 marcatori nei pazienti con insufficienza cardiaca cronica era marcatamente elevata rispetto ai controlli appaiati per età e sesso, anche in assenza di una diminuzione in GFR (Damman et al 2008; Damman et al.; 2010)

Inoltre, sia NAG che KIM-1 prevedevano il risultato clinico anche rapportati al GFR. Questi marcatori sembrano essere centrali nella fisiopatologia del coinvolgimento renale nella malattia cardiaca. Indicano la presenza di danno tubulo-interstiziale nella sindrome cardiorenale, che può svilupparsi come conseguenza della diminuzione della perfusione e aumento della congestione anche in presenza di GFR normale. Gli studi sulle malattie renali, inoltre, hanno dimostrato che questi marker urinari riflettono il miglioramento del danno intrarenale mediante intervento nefro-protettivo mediante blocco RAAS (Kramer et al.; 2009; Waanders et al.;2009)

Con la loro elevata sensibilità e specificità, nuovi studi potrebbero utilizzare questi marcatori per la diagnosi precoce del danno tubolare e la valutazione degli effetti del trattamento anche in medicina veterinaria.

### **III.MECCANISMO DELLA RESISTENZA AL DIURETICO**

I diuretici sono considerati essenziali per rimozione del fluido nella malattia cardiaca (Chronic Heart Failure-CHF), ma le pubblicazioni sull'efficacia relativa dei diuretici nei cani sono scarsi (Adin et al 2019). I diuretici dell'ansa per via endovenosa sono comunemente somministrati per favorire la diuresi, la natriuresi, (come riportato in figura 4.4) e per migliorare la congestione in questi pazienti, favorendo un miglioramento della sintomatologia alcuni studi hanno riscontrato che talvolta il loro uso nei pazienti ospedalizzati è stato associato a esiti infausti. Nella figura 4.4 sono rappresentati i siti d'azione dei vari diuretici utilizzati nello scompenso cardiaco, in questa trattazione prenderemo in considerazione i diuretici d'ansa.



**FIGURA 4.4: Terapia diuretica, siti d'azione.** (1) L'acetazolamide funziona nel tubulo prossimale bloccando l'anidraasi carbonica e aumentando l'escrezione di NaHCO<sub>3</sub>. (2) Mannitolo funziona sia nel tubulo prossimale che nell'ansa di Henle aumentando l'escrezione di H<sub>2</sub>O. (3) I diuretici dell'ansa, come la furosemide, funzionano nella branca ascendente dell'ansa di Henle bloccando il cotrasportatore sodio-cloruro-potassio e aumentando escrezione di sodio, potassio e cloruro. (4) I diuretici tiazidici funzionano nel tubulo contorto distale, bloccando il trasportatore del cloruro di sodio e aumentando l'escrezione di cloruro di sodio (5) Gli antagonisti del recettore dei mineralcorticoidi funzionano nel dotto collettore del tubulo distale e antagonizzano il recettore dell'aldosterone, aumentando così escrezione di sodio e ritenzione di potassio. Da Ter Maaten JM, Valente M a E, Damman K, Hillege HL, Navis G, Voors A a. Diuretic response in acute heart failure-pathophysiology, evaluation, and therapy. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(3):184-192.

Nel paziente in scompenso cardiaco, la diminuzione della gittata cardiaca porta ad insufficiente riempimento arterioso, stimolando così l'attivazione dei meccanismi compensatori, ovvero l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone e aumento del riassorbimento del sodio nel tubulo prossimale. Meccanismi che in medicina d'urgenza, consideriamo una

compensazione fisiologica attesa e positiva quando si tratta di un paziente in shock ipovolemico per altre cause, ma che durante lo shock cardiogeno provocano l'esatto contrario, ovvero alla ritenzione di sodio e acqua dovuta a natriuresi e diuresi inadeguate, segni distintivi di insufficienza cardiaca. Anche l'insufficienza cardiaca risulta mediata dai barocettori con l'attivazione del sistema nervoso simpatico promuove vasocostrizione e contribuisce all'ulteriore attivazione di RAAS e alla ritenzione idrica e renale di sodio (Levine, et al.; 1982).

I pazienti con scompenso cardiaco hanno un ridotto tasso di escrezione renale di sodio, la cui ritenzione è stata strettamente correlata con aumento del peso corporeo. I diuretici dell'ansa vengono somministrati per inibire il riassorbimento di sodio nella branca ascendente dell'ansa di Henle e hanno lo scopo di aumentare la natriuresi. Quando sono efficaci, il sodio urinario aumenta e il potassio urinario diminuisce.

Una scarsa risposta alla terapia diuretica può derivare da:

- scarso assorbimento intestinale
- ipoalbuminemia
- somministrazione orale del diuretico d'ansa
- diminuzione della perfusione renale
- volume di distribuzione aumentato
- alterazione della secrezione tubulare
- ipertrofia tubulare renale
- presenza di acidi organici circolanti che inibiscono il trasportatore dell'anione organico portando ad una diminuzione dell'effetto dei diuretici con conseguente alterata escrezione urinaria di sodio (Ter Maaten et al.; 2015).

Se somministrati per via orale i diuretici devono prima essere assorbiti nell'intestino per entrare nel flusso sanguigno. In presenza di edema gastrointestinale o ipoperfusione intestinale,

l'assorbimento dei diuretici somministrati *per os* è compromesso e potrebbe differire sostanzialmente tra i diuretici. Ad esempio, l'assorbimento di bumetanide e torasemide sono probabilmente migliori della furosemide in queste condizioni (Ter Maaten et al.;2015). Per via endovenosa la performance di assorbimento è migliore rispetto alla via orale. Nei pazienti con insufficienza renale o insufficienza cardiaca, è necessario una dose diuretica più elevata per ottenere gli stessi effetti e, nel tempo, l'aumento del dosaggio di diuretici diventerà meno efficace (Ellison et al.;2001. Ter Maten et al.;2015). In secondo luogo, la maggior parte dei diuretici dell'ansa, i diuretici tiazidici, il metolazone e l'acetazolamide si legano all'albumina plasmatica, la bumetanide, invece, perché può legarsi alle globuline plasmatiche. Queste molecole non sono oggetto di studio in medicina veterinaria e questi dati sono estrapolati dalla letteratura di medicina umana. Questi diuretici agiscono sul loro bersaglio molecolare dal lato luminale, di conseguenza, questi farmaci devono essere filtrati dal glomerulo e secreti attivamente nel lume tubulare dal trasportatore di anioni organici (OAT) del tubulo prossimale per espletare la loro funzione (Uwai et al.;2000). L'ipoalbuminemia, è comune in pazienti con insufficienza cardiaca, compromette l'assorbimento e la secrezione di furosemide attiva e ne migliora la conversione la sua forma inattiva. (Jackson et al.;2009. Hesse et al.;1976). Inoltre, l'albumina persa nel tubulo potrebbe legare la furosemide e impedirne l'azione sul co-trasportatore sodio-cloruro-potassio (Bowman, 1975).

In medicina umana la somministrazione concomitante di albumina e furosemide migliora risposta diuretica in pazienti con cirrosi, sindrome nefrosica o malattia renale cronica, ma nessun dato è disponibile in soggetti con insufficienza cardiaca. In medicina veterinaria non è un protocollo applicabile, in quanto l'albumina sintetica canina non è disponibile sul mercato europeo. In terzo luogo, i pazienti con insufficienza cardiaca e renale cronica hanno livelli elevati di acidi organici circolanti, come l'azoto ureico, che in modo competitivo può inibire il

trasportatore di anioni organici e ridurre ulteriormente la disponibilità diuretici nel sito di azione (Krick et al.;2000;.Sweet et al.;2001)

Il RAAS e l'attivazione del sistema nervoso simpatico porta al riassorbimento passivo flusso-dipendente dell'urea nel tubulo distale; un gradiente di concentrazione creato dall'aumento di riassorbimento sodio e di acqua nel tubulo prossimale provoca diminuzione del flusso distale e aumento del riassorbimento (Schrier, 2008; Kazory 2010)

Elevati livelli di azoto ureico circolante, quindi, non solo contribuiscono direttamente alla resistenza ai diuretici, ma riflettono anche un rene che sta attivamente lavorando per trattenere sodio e acqua. Di conseguenza, l'efficacia del diuretico è variabile, nei pazienti con insufficienza cardiaca, alterato assorbimento, diminuzione del flusso sanguigno renale, iperazotemia, ipoalbuminemia e proteinuria (con conseguente riduzione dei livelli di diuretici attivi nel lume tubulare).

All'inizio del trattamento diuretici, l'effetto natriuretico si traduce nel bilancio di sodio negativo. La conseguente diminuzione del volume extracellulare innesca una risposta omeostatica, mediata dall'attivazione del RAAS e il sistema nervoso simpatico, portando a aumento della ritenzione di sodio nei siti tubulari non mirati dal diuretico specifico. (Wilcox 1983; Loon et al.; 1989). Dopo alcuni giorni, questa risposta omeostatica controbilancia l'effetto diuretici del farmaco, equilibrando l'escrezione e l'assunzione di sodio e creando un nuovo stato stazionario con un volume extracellulare inferiore. Questo fenomeno di "braking" o "frenata" è una risposta omeostatica appropriata che impedisce l'esaurimento eccessivo del volume durante continua terapia diuretici. Tuttavia, nei pazienti con iperaldosteronismo secondario preesistente, come quelli con insufficienza cardiaca, questo fenomeno può essere importante, provocando un rapido e abbondante riassorbimento del sodio e contribuendo alla resistenza ai diuretici (Brater, 1998).

Persino quando i diuretici vengono somministrati per via endovenosa, diuretico si può riscontrare un "braking", che annulla la natriuresi prevista e contribuisce alla resistenza ai diuretici nei pazienti con scompenso cardiaco.

Il "braking" tradotto letteralmente come rallentamento dell'assorbimento: aumento della capacità di riassorbimento di NaCl nel nefrone distale dopo l'esposizione a un carico cronico di sodio, avviene per questi meccanismi:

- Ipertrofia delle cellule del dotto distale dovuto dal persistente carico "delivery" di sodio o diuretici al tubulo distale contribuisce all'ipertrofia delle cellule tubulari distali che bypassa l'effetto sul tubulo prossimale del diuretico d'ansa e si traduce in una maggiore ritenzione di sodio (Kaissling, B et al.;1985).
- Incremento dell'attività a livello basolaterale della pompa N/K ATPasi

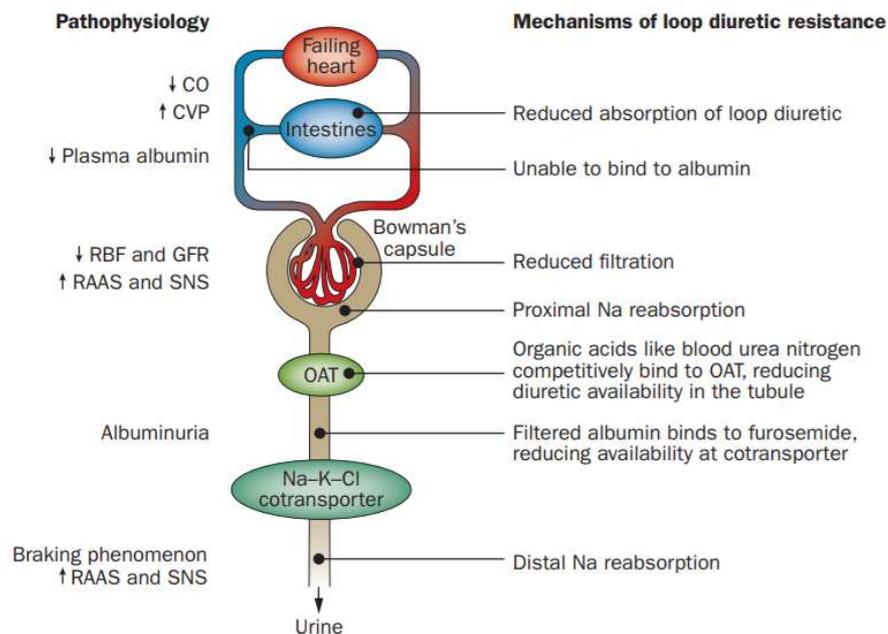
Altri meccanismi non cardiaci che determinano una ridotta risposta ai diuretici, dovrebbero essere presi in considerazione, compreso il flusso sanguigno renale ridotto causato stenosi dell'arteria renale anche o interazioni farmacologiche quando si somministrano diuretici dell'ansa ai pazienti.

I meccanismi di resistenza al diuretico sono riassunti nella figura 4.5.

Natriuresi e diuresi inadeguate nei pazienti che sviluppano resistenza ai diuretici sono stati associati a prolungamento della degenza ospedaliera e aumento della mortalità (Voors et al.; 2014). La frazione escreta del Sodio (FeNa) è la percentuale di sodio filtrata dal rene ed escreto nelle urine; è stato utilizzato per valutare natriuresi nei pazienti con malattia cardiaca in medicina umana, (Gabrielsen et al.;2001)

La FeNa di riferimento è ridotta a meno dell'1,0% nei pazienti con malattia cardiaca e a basale FeNa inferiore allo 0,2% è associato a scarsa risposta natriuretica. La combinazione di insufficienza della pompa cardiaca, attivazione neuro-

ormonale e terapie per l'insufficienza cardiaca, in particolare gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina e i bloccanti dei recettori dell'angiotensina, può alla fine superare la capacità del rene di compensare una ridotta perfusione (Hillege et al.;2000). Inoltre, aumento turgore venoso e le pressioni addominali dovute all'ascite possono aumentare il post-carico renale e la pressione intrarenale, e ridurre il gradiente di perfusione transrenale (e quindi la pressione di perfusione renale), aumenta anche la pressione interstiziale renale (direttamente pressione di filtrazione opposta) e il tutto contribuisce ulteriormente al danno renale.



**FIGURA 4.5 Meccanismi di resistenza ai diuretici dell'ansa.** I pazienti resistenti ai diuretici dell'ansa potrebbero avere un ridotto assorbimento del farmaco nell'intestino, ridotta filtrazione o aumento del riassorbimento di sodio prossimale o distale nel rene, o ridotta disponibilità di farmaci nel tubulo. Abbreviazioni: CO, gittata cardiaca; CVP, pressione venosa centrale; GFR, velocità di filtrazione glomerulare; OAT, trasportatore anione organico; RAAS, sistema renina-angiotensina-aldosterone; RBF, flusso sanguigno renale; SNS, sistema nervoso simpatico. Da Ter Maaten JM, Valente M a E, Damman K, Hillege HL, Navis G, Voors A a. Diuretic response in acute heart failure-pathophysiology, evaluation, and therapy. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(3):184-192.

Tipicamente, cani con CHF scompensano, nonostante l'aumento dei dosaggi di farmaci o a causa degli effetti collaterali degli stessi. Si ritiene che la resistenza ai diuretici svolga un ruolo nella progressione della malattia cardiaca negli esseri umani, purtroppo sono disponibili poche informazioni per documentare questo fenomeno nella specie canina. La conoscenza dell'esistenza e le cause alla base della mancata risposta ai diuretici potrebbero guidare il trattamento e apportare delle modifiche nelle scelte terapeutiche, dirette al ripristino della diuresi e al miglioramento della qualità e della durata della vita.

La resistenza ai diuretici è identificata fino al 17% delle persone con CHF e si sospetta che si verifichi anche nei cani (Oyama et al.; 2011. Doering et al.;2017)

Sebbene siano segnalati casi di resistenza ai diuretici manca la letteratura in medicina veterinaria, l'American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) considera la resistenza ai diuretici nella descrizione della cardiopatia refrattaria (HD), denominata Stadio D (Atkins et al.;2009). In medicina umana la resistenza al diuretico è associata negativamente alla prognosi nei pazienti con CHF, quindi, il riconoscimento precoce diventa prioritario (Singh et al.; 2014; ter Maaten et al.; 2015)

Il dosaggio del diuretico non sempre correla positivamente con la risposta diuretica, che può essere subottimale (Hori et al.;2007; Testani et al.; 2015). Possibili cause di una mancata risposta, o di una risposta non ottimale, includono: un assorbimento inadeguato del farmaco a livello gastroenterico, una diminuzione del trasporto tubulare renale, dell'ipertrofia delle cellule dell'ansa di Henle e l'attivazione del sistema Renina Angiotensina Aldosterone (RAAS) (ter Maaten et al.; 2015).

Nell'uomo, la resistenza ai diuretici è definita come CHF persistente nonostante un dosaggio appropriato di furosemide; la frazione escreta del sodio (FE Na) <0,2%; fallimento di

un'adeguata natriuresi dopo somministrazione di furosemide; o rapporto sodio/potassio urinario (uNa:uK) <1.0 (ter Maaten et al.;2016; Doering et al.;2017). Alcuni studi sulle persone con CHF hanno anche associato una scarsa risposta diuretica con scarsa concentrazione di sodio urinario (uNa), ipocloremia e basso rapporto sodio: furosemide urinaria (uNa:uFur), quest'ultimo insensibilità al diuretico (Kumar D et al.;2015).

Identificazione dei meccanismi che predispongono alla resistenza al diuretico nei cani potrebbe indirizzare strategie preventive o trattamenti per il ripristino della diuresi efficace nei pazienti che soffrono di CHF in fase scompensata.

## **5. PRESENTAZIONE DEL LAVORO DI RICERCA SULLE FRAZIONI ECRETE E LORO POTENZIALE LEGAME PER COMPRENDERE MEGLIO IL FENOMENO DELLA RESISTENZA AI DIURETICI**

In questo studio, accettato per la pubblicazione sul Journal of Veterinary Cardiology, abbiamo valutato prospetticamente l'impatto della terapia orale con furosemide sulla chimica urinaria, nei cani con malattia della valvola mitrale mixomatosa ACVIM stadio C. Nello specifico, i cani inclusi (n=73) sono stati divisi in base a un tempo di campionamento nel gruppo mattutino di 1-6 ore e un gruppo serale > 6 ore dalla somministrazione orale di furosemide. Una maggiore escrezione urinaria di elettroliti è stata documentata nei cani valutati al mattino rispetto a quelli valutati alla sera. Tali differenze sono state attribuite all'effetto della terapia con furosemide sulla manipolazione degli elettroliti renali. Sono stati inclusi Un gruppo di cani sani (n=106), campionati al mattino e alla sera per valutare la possibilità di variazione circadiane delle concentrazioni di elettroliti urinari, non è stata notata nessuna differenza in questi ultimi. La chimica urinaria ha ricevuto una crescente attenzione per stimare la risposta diuretica nei cani con malattie cardiache.

I nostri risultati confermano che, nei cani sottoposti a terapia diuretica, l'interpretazione della chimica delle urine è fortemente influenzata dai tempi di prelievo di sangue e di urine. Le nostre scoperte potrebbero avere importanti implicazioni sia in campo clinico che di ricerca per indagare adeguatamente la risposta diuretica e per comprendere meglio il fenomeno della resistenza ai diuretici.

## I. PUBBLICAZIONE

Accettata a Gennaio 2022 dal Journal of Veterinary Cardiology. È riportato qui di seguito il draft della versione pre-print.

**Journal of Veterinary Cardiology**  
**Effect of sampling time on urinary electrolytes following oral furosemide administration  
in dogs with myxomatous mitral valve disease**  
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JVC-D-21-00059R4
Article Type:	Original article
Keywords:	diuretic; fractional excretion; Heart disease; natriuresis; urine chemistry
Corresponding Author:	Roberta Troia, DVM, PhD, Dipl. ECVECC Alma Mater Studiorum University of Bologna: Università di Bologna Ozzano dell'Emilia, Bologna ITALY
First Author:	Maria Chiara Sabetti, DVM
Order of Authors:	Maria Chiara Sabetti, DVM Francesca Fidanziò, DVM Roberta Troia, DVM, PhD, Dipl. ECVECC Linda Perissinotto, DVM Giovanni Romito, PhD Chiara Mazzoldi, DVM Cecilia Quintavalla, PhD, Prof. Serena Crosara, PhD Francesco Dondi, PhD, Prof.
Abstract:	<p><b>Introduction/Objectives:</b> Urine chemistry has received growing attention to estimate the diuretic response in dogs with cardiac disease.</p> <p><b>Aim of the study</b> was to evaluate the impact of time elapsed between oral furosemide administration and sample collection on urine chemistry in dogs with myxomatous mitral valve disease (MMVD) receiving diuretic therapy in American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) stage C.</p> <p><b>Materials and Methods:</b> Seventy-three MMVD ACVIM stage C dogs and 106 healthy dogs were prospectively included. MMVD dogs were divided, based on a time of sampling, in morning group (MMVD-MG) of one to six hours, and an evening group (MMVD-EG) over six hours from oral furosemide administration. Analogously, healthy dogs sampled between 9 a.m. and 1 p.m. and between 2 and 7 p.m. were divided in a morning group (H-MG) and an evening group (H-EG), respectively. Urine chemistry, including fractional excretion (FE) of electrolytes, was evaluated and compared among groups.</p> <p><b>Results:</b> Higher excretion of sodium and chloride, and higher urine sodium to urine potassium ratio (uNa:uK) were detected in MMVD-MG compared to MMVD-EG (P=0.021, P=0.038, and P=0.016, respectively). Natriuresis, chloriuresis, and uNa:uK were higher in MMVD-MG compared to H-MG, while no differences were found in the comparison between H-MG and H-EG and between MMVD-EG and H-EG.</p> <p><b>Conclusions:</b> Urinary electrolyte excretion is significantly increased within six hours from furosemide administration in MMVD ACVIM stage C dogs. Time of sampling from furosemide administration significantly affects urine chemistry in MMVD dogs and should be considered in clinical practice and the research field.</p>
Response to Reviewers:	

## **Introduction**

Myxomatous mitral valve disease (MMVD) is a common acquired cardiac disease in dogs, and often leads to congestive heart failure (CHF) [1]. Furosemide is the most widely used loop diuretic employed to treat this condition [1,2]. Despite its extensive use in dogs with naturally-acquired MMVD, the kinetic and diuretic effects of furosemide have mainly been investigated in healthy dogs, dogs with experimentally-induced CHF, and small canine populations affected by various heart diseases [3–8]. The bioavailability of oral furosemide, which is the preferred route of administration for the treatment of chronic MMVD, is approximately 77% in dogs [9]. Furosemide-induced natriuresis is dose-dependent and usually disappears six hours after oral administration, requiring at least two administrations per day for a sustained diuretic effect [4,7].

In human medicine, diuretic efficacy is assessed based on the relief of CHF-related signs, weight loss, urine output, and urine composition including natriuresis quantification [10,11]. In humans, urine sodium excretion has received growing attention as a cost-effective and readily available biomarker to estimate an appropriate diuretic response and for early recognition of diuretic resistance in patients with heart failure [12–15]. Similarly, monitoring of urine electrolytes has recently caught the attention in veterinary medicine [8,16]. However, the correct interpretation of urinary electrolytes may be challenging without robust background knowledge. For example, possible circadian fluctuations, as well as variations in the timing of diuretic administration and sample collection, might complicate the interpretation of urinary electrolytes in healthy dogs and dogs with CHF, and inconsistency in the timing of sampling was reported as a possible limit of investigation [8,16]. To date, little attention

has been paid to these possible confounding factors in dogs, unlike human medicine [12,13,17].

Therefore, the objectives of this study were: (1) to evaluate the impact of the time frame occurring between oral furosemide administration and sample collection on the concentration of urinary electrolytes in MMVD dogs with American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) stage C, with medically-controlled CHF; and (2) to explore the possible morning vs. evening fluctuations of urinary electrolytes in a group of healthy, untreated dogs. The hypothesis was that: (1) MMVD dogs evaluated within six hours post-furosemide would have significantly higher urinary sodium, chloride, and other electrolytes if compared to dogs evaluated between six to 12 hours post-furosemide; and that (2) no relevant daily fluctuations of urinary electrolytes occur in healthy, untreated dogs.

## **Materials and Methods**

This was a prospective, observational study performed at the Veterinary University Hospitals (VUH) of two University Institutions (University of Bologna and University of Parma) between March and December 2020.

### **Study population**

Privately owned dogs were enrolled at the cardiology services of both centers. Dogs were eligible for inclusion if they were affected by MMVD at ACVIM stage C, diagnosed, and classified according to the current guidelines [1], and if they were receiving exclusively oral furosemide as a loop diuretic. Further inclusion criteria were the following: 1) oral furosemide had to be administered twice daily at a stable dosage for at least one week prior to enrollment; 2) morning oral administration of furosemide had to occur between 7:00 and 8:00 a.m., at home by the owner; and 3) 12-hour fasting had to be guaranteed at the time of sample collection. Water supply was always

available. Additional cardiac medications were allowed at standard dosages, according to published guidelines [1]. For the purpose of this study, specific diet restrictions were not imposed, and owners could feed their dogs their preferred diets.

Exclusion criteria were the following: 1) presence of other acquired or congenital cardiac diseases; 2) presence of one or more concomitant systemic diseases including endocrinopathies, neoplasia, International Renal Interest Society Stage 3 and 4 chronic kidney disease, acute kidney injury, and acute or chronic gastro-enteropathy with malabsorption; 3) acute CHF requiring emergency treatment (e.g. hospitalization with administration of intravenous furosemide); 4) concomitant treatments except of cardiac therapy such as pimobendan, spironolactone, angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI); 5) use of loop diuretics other than furosemide (e.g. torasemide).

Healthy dogs were included as controls for comparative purposes. These dogs were owned by medical staff or students attending the VUH. Dogs were considered healthy in the absence of any clinical signs at the time of sample collection and within the previous two months, and in the absence of clinicopathological abnormalities at complete blood count, serum chemistry profile, and urinalysis. Dogs should not have received any medications within the preceding two months before inclusion in the study, except for routine preventative healthcare. At time of sample collection, 12-hour fasting had to be guaranteed, while water supply was always assured.

The study was approved by the local Scientific ethical committee for animal testing, animal utilization (Protocols 747) and conducted with an informed owner consent.

### **Study groups**

The cardiologists of the VUH participating in the study performed the first consultations and routine rechecks between 9:00 a.m. and 7:00 p.m. Such habits were not modified to accomplish the purpose of the study; thus, patient enrollment was conducted in line with

daily clinical practice. Dogs with MMVD fulfilling the inclusion criteria were grouped based on the time of sample collection. The MMVD morning group (MMVD-MG) included dogs examined between 9:00 a.m. and 1:00 p.m. (from one to six hours after furosemide administration); the MMVD evening group (MMVD-EG) included dogs examined between 2:00 p.m. and 7:00 p.m. (over six hours after furosemide administration).

Healthy dogs were also divided into two groups according to the time of blood and urine sampling: the healthy morning group (H-MG) was sampled between 9:00 a.m. and 1:00 p.m.; the healthy evening group (H-EG) between 2:00 p.m. and 7:00 p.m.

#### Clinical and clinicopathological data

Recorded clinical data were signalment, including body weight, medical history, physical and echocardiographic examination findings, current medications and dosage, time elapsed from the morning furosemide administration, duration and dose of furosemide therapy.

Blood specimens were collected by standard venipuncture using blood vacuum collection systems; concurrent fresh urine samples were collected by spontaneous voiding or cystocentesis. Blood and urine specimens were processed on a routine basis, according to quality standard procedures, and evaluated at Bologna VUH within one hour of collection. When it was not possible to perform the chemistry analysis within one hour, serum and urine samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , up to a maximum storage period of two months.

The chemistry profile included serum creatinine (sCr), urea, total proteins, albumin, and the following serum electrolytes: sodium, chloride, potassium, magnesium, calcium, phosphate. Serum chemistry was determined using an automated chemistry analyzer.

Urinalysis included urine specific gravity evaluated by a hand refractometer, dipstick tests read by an automated reader and confirmed by visual inspection, microscopic sediment evaluation performed at low power field (100X) and high-power field (400X), and urine chemistry. Urine sediment was obtained after five-minute centrifugation at 450 g. Urine supernatants were immediately analyzed for dipstick examination, and then used for chemical analyses or stored. Urine chemistry was determined using the same automated chemistry analyzer used for serum chemistry, and included urinary creatinine ([uCr]), urine total proteins, urine proteins to [uCr] ratio, and the following urinary electrolyte concentrations: urine sodium ([uNa]), chloride ([uCl]), potassium ([uK]), magnesium ([uMg]), calcium ([uCa]), and phosphate. The [uNa] to [uK] ratio (uNa:uK) was calculated. The ratio with [uCr] was calculated for [uNa] (uNa:uCr), [uCl] (uCl:uCr), and for other urinary electrolytes. Fractional excretion (FE) of sodium (FENa), chloride (FECl), potassium (FEK), magnesium, calcium, and phosphate were also calculated to evaluate electrolytes excretion. Analogous to uNa:uK, the FENa to FEK ratio (FENa:FEK) was calculated. Fractional excretion of solute X was calculated according to the equation reported previously [18], as follows:

$$FE\ X = \frac{uX\ sCr}{uCr\ sX} \text{ (based on spot urine sample)}$$

where uX and sX were the concentrations of a specific analyte in urine and serum, respectively, and sCr and [uCr] were serum and urine creatinine respectively. FE was reported in percentages.

### **Statistical analysis**

Data were expressed by standard descriptive statistics and presented as mean  $\pm$  standard deviation or median and range (minimum–maximum value), based on their distribution. Normality was assessed graphically and by using the Shapiro–Wilk test. Differences between MMVD-MG and MMVD-EG dogs and among these groups and their healthy

counterparts (H-MG and H-EG) were evaluated using an independent sample t-test or Mann–Whitney U test without multiple testing corrections for normally and non-normally distributed data, respectively. Categorical variables were compared between groups using the Fisher exact test. Correlation between variables was assessed using Pearson r or Spearman rank correlation, based on data distribution. Results were considered significant when  $P < 0.05$ . Statistical analyses were performed using an online available statistical software package.

## **Results**

### Baseline characteristics

During the study period, 73 dogs with MMVD met the inclusion criteria: 29/73 (40%) were females (three neutered) and 44/73 (60%) were males (15 castrated); 42/73 (58%) were mixed breed dogs, 31/73 (42%) were purebred dogs. The median body weight was 7.4 kg (range 2.6–19), the median age was 12 years (range 6–16).

Overall, 47/73 dogs belonged to MMVD-MG and 26/73 to MMVD-EG. All dogs were treated with furosemide and pimobendan at a median dosage of 4 mg/kg/day (range 1.1–8) and 0.5 mg/kg/day (range 0.3–1), respectively. Additionally, 63/73 cases received ACEI (enalapril or benazepril) at a median dosage of 0.8 mg/kg/day (range 0.7–0.8) and 0.6 mg/kg/day (range 0.20–1.4), respectively, and 20/73 received spironolactone at a median dose of 2.07 mg/kg/day (range 1.7–2.8). There was no difference between the MMVD-MG and MMVD-EG in terms of treatment dosages (furosemide  $P=0.38$ , pimobendan  $P=0.91$ , ACEI  $P=0.29$ , spironolactone  $P=0.84$ ) and number of patients receiving ACEI or spironolactone ( $P=0.08$ , and  $P=0.41$ , respectively) (Table 1). A further comparison between MMVD-MG receiving ACEI and/or spironolactone vs. MMVD-MG not receiving ACEI and/or spironolactone was performed. No relevant differences were noticed (Table A, available in Supplemental Material on-line). This

comparison was not possible for MMVD-EG, because only one dog not receiving these treatments.

One-hundred and six healthy dogs were included as controls. The median age was 3.9 years (range 1–10), and the median body weight was 23.9 kg (range 3–78). Sex distribution was as follows: 54/106 (51%) were females (27 neutered), and 52/106 (49%) were males (36 castrated). Fifty-five out of 106 (52%) were mixed breed dogs, whereas 51/106 (48%) were purebred dogs. Overall, 56/106 dogs belonged to the H-MG, while 50/106 belonged to H-EG (Table 1). MMVD dogs had a greater median age and a lower median body weight compared with healthy dogs ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$ , respectively).

### **Clinicopathological data**

No statistical difference was observed between MMVD-MG and MMVD-EG for sCr, urea, and serum electrolytes. Dogs included in MMVD-MG had significantly lower [uCr], and higher natriuresis, expressed as [uNa], uNa:uCr, and FENa, compared to the MMVD-EG. Similarly, MMVD-MG dogs had higher chloruresis ([uCl], uCl:uCr, FECl) and calciuresis ([uCa], [uCa] to [uCr] ratio, FECa), as well as higher [uK] to [uCr] ratio, FEK, [uMg] to [uCr] ratio and FE of magnesium compared to MMVD-EG ones, while [uK] and [uMg] were not different in this comparison. Urinary sodium to potassium ratio and FENa:FEK were significantly higher in MMVD-MG compared to MMVD-EG dogs. The majority of the urinary variables of interest (uNa:uK, uNa:uCr, uK:uCr, FENa:FEK, FENa, FECl and FEK) resulted significantly negatively correlated with the time from morning furosemide administration expressed in hours. Conversely, no correlation was documented between urinary electrolytes and the duration of furosemide treatment (days), nor with the dose of furosemide therapy (mg/kg/day) (Table B, available in Supplemental Material on-line). No significant difference was noted for urinary

electrolytes in healthy control dogs between H-MG and H-EG. Complete laboratory data are reported in Table 2 and Figure 1-3.

A further comparison between MMVD-MG and H-MG, and between MMVD-EG and H-EG, respectively, was performed. Urine creatinine and urine specific gravity were significantly lower in MMVD-MG and MMVD-EG if compared with H-MG and H-EG, respectively ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$ , for both evaluations). If compared with their healthy counterparts (H-MG and H-EG, respectively), MMVD-MG and MMVD-EG had significantly lower [uNa] ( $P = 0.0016$  and  $P < 0.0001$ ), [uCl] ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$ ), [uK] ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$ ), [uMg] ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$ ), and urine phosphate ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$ ). Moreover, [uCa] was higher only in MMVD-MG if compared to H-MG ( $P = 0.037$ ).

Dogs included in MMVD-MG and MMVD-EG, when compared with their healthy counterparts, had a significantly increased [uK] to [uCr] ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.0007$ ), [uMg] to [uCr] ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.0007$ ), [uCa] to [uCr] ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$ ), and urine phosphate to [uCr] ( $P = 0.0013$  and  $P < 0.0001$ ) ratio. Similar results were reported for FEK ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$ ), FE of magnesium ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.0001$ ), FE of calcium ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$ ), and FE of phosphate ( $P = 0.0001$  and  $P < 0.0001$ ).

In addition, uNa:uCr, uCl:uCr, uNa:uK, FENa, FECl, and FENa:FEK were significantly increased only in MMVD-MG if compared with H-MG ( $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0017$ ,  $P = 0.0001$ ,  $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0004$ , and  $P = 0.0001$ , respectively) (Table 2, Figure 1-3).

Urinary electrolytes were further compared within the group of healthy dogs grouped by categories based on age and body weight (dogs > 6 years vs dogs < 6 years; dogs > 20 kg vs dogs < 20 kg). No clinically significant difference was observed (Table C available in Supplemental Material on-line).

## **Discussion**

The present study demonstrates a strong influence of the time frame occurring from oral furosemide administration to sample collection on the concentration of urinary electrolytes in dogs with stable MMVD ACVIM stage C. Previous studies in healthy dogs and dogs with cardiac disease observed a peak diuretic effect after two hours and a return to baseline after six hours from oral administration of furosemide [4,5,7,8]. Thus, we hypothesized that natriuresis would be higher within the first six hours after oral furosemide administration, and we divided MMVD dogs into two groups according to the time elapsed from diuretic therapy to sample collection. As expected, we found that cardiopathic dogs sampled in the morning (MMVD-MG) had significantly higher sodium and chloride urinary excretion (when evaluated as concentrations, normalized with [uCr] or FE) compared to those evaluated in the evening (MMVD-EG). Hence, the time elapsed from furosemide administration to sample collection should be viewed as a prerequisite to allow proper urine chemistry interpretation in this setting.

The uNa:uK is a short-term biomarker of renin–angiotensin–aldosterone system activation in many species [19-21]. In humans, a uNa:uK < 1 is representative of inadequate urine production and diuretic resistance [21]. In patients who develop resistance, more sodium is reabsorbed at the distal tubular level; decreased sodium excretion and stable potassium excretion result in a decreased ratio compared to non-resistant patients [22]. A cut-off for uNa:uK to identify an inadequate diuretic response has not been established in dogs. A study in healthy dogs showed that urinary volume is closely related to the uNa:uK, which seems a useful indicator of urine production after diuretic administration [23]. In that study, the uNa:uK increased in the first hour of constant rate infusion of furosemide and then progressively decreased in parallel to a reduction in urinary output [23]. In a prospective trial including a small population of

dogs with congestive heart failure (n = 6) receiving furosemide, the uNa:uK resulted significantly correlated with urine volume; lower uNa:uK was detected in dogs with reduced diuretic response (median values 1.49) [8]. The median uNa:uK measured in cardiopathic ACVIM stage C dogs in another study, was 1.15 [16]. In our study, uNa:uK was significantly higher in MMVD-MG compared to MMVD-EG with a median value of 1.67 vs. 0.93, respectively. Although urine output was not quantified in the current study, it might be assumed that the lower uNa:uK noticed in MMVD-EG dogs and its negative correlation with the time elapsed from furosemide administration, reflected reduced sodium excretion potentially linked to reduced urine production > 6 hours since furosemide administration, similarly to previous observations [8]. Overall, our data indicate that beyond 6 hours, FENa and uNa:uK in MMVD dogs are not significantly different than healthy dogs, suggesting that the pharmacodynamic effect of furosemide has worn off. Hence, sampling of urine beyond 6 hours as a mean to determine diuretic response is not clinically useful. Thus, as part of urinary chemistry, the uNa:uK is also affected by the timing of diuretic administration, which should therefore be considered for correct interpretation of these data.

As mentioned above, the chronic use of furosemide could lead to resistance development. Diuretic resistance has not been unanimously defined in humans, although it has been described as the failure to achieve relief from signs of CHF despite a full dose of diuretic [24] or as the failure to reduce the volume of extracellular fluid despite the appropriate use of diuretics [25]. Diuretic resistance affects up to 17% of people with heart failure [21] and it is suspected to also occur in dogs [8,16,23]. It is crucial to recognize this condition in order to adjust treatment and formulate a prognosis. In humans, several biochemical markers and specific cut-offs have been proposed to diagnose diuretic resistance, including FENa < 0.2% and spot [uNa] < 50 mEq/L [21,26].

Patients' responses to diuretic therapy have been related to pre-treatment FENa, with low values being associated with a blunted natriuretic response after furosemide administration, both in acute and chronic settings. In veterinary medicine, no markers of diuretic resistance have been conclusively established; however, analysis of the concentration of urinary electrolytes and their FEs appears promising, based on preliminary studies [8,16,23]. In a previous study, Adin et al. found that during a five-hour constant rate infusion of furosemide (3.3 mg/kg diluted with 5% dextrose in water to a final concentration of 2.2 mg/mL) in six healthy dogs, the [uNa] (and the uNa:uK) increased in the first hour and then progressively decreased in parallel to a reduction in urinary output, suggesting an early braking phenomenon [23]. A subsequent study from the same group evaluated urinary electrolyte concentrations in a large cohort of cardiopathic dogs, demonstrating that both the FENa and FECl were significantly higher in ACVIM stages C and D dogs receiving diuretics compared to dogs with preclinical disease [16]. In that study, samples were likely collected four to six hours after furosemide administration; however, the time elapsed between diuretic intake and sample collection was not specifically reported in the study methods. In a prospective trial investigating formulas to predict cumulative urine sodium and volume in eight healthy dogs and six dogs with congestive heart failure receiving oral furosemide, dogs fulfilling the criteria of low diuretic response showed lower [uNa] and uNa:uK compared with dogs with an adequate diuretic response. Indeed, in that study dogs with net fluid gain excreted less [uNa] [8]. Our results further support the importance of considering the time elapsed from diuretic administration when assessing urinary sodium, chloride, and even uNa:uK excretion in dogs receiving furosemide, in order to obtain reliable and meaningful data, correctly assess tubular function, and evaluate the expected patient

response to diuretic therapy. This forms the basis for future studies on markers of diuretic resistance in dogs.

Kaliuresis (reported as both FEK or [uK] to [uCr] ratio, but not as [uK]) was higher in MMVD-MG compared to MMVD-EG. This result is likely related to the diuretic action. In fact, furosemide, by blocking the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl channel at the level of Henle's loop, also blocks potassium reabsorption resulting in increased urinary excretion [23]. An increased kaliuresis in dogs receiving furosemide has already been described in healthy dogs and in dogs with iatrogenic mitral regurgitation receiving intravenous or oral diuretic therapy, respectively [4,23]. Moreover, a recent investigation conducted in dogs with heart disease (MMVD or dilated cardiomyopathy) reported an increased FEK in patients with furosemide therapy vs. patients without furosemide therapy [16]. Data regarding kaliuresis in the above-mentioned study are similar to our results; however, due to differences in study setting, case composition, and intervals between furosemide administration and sampling, a more detailed comparison is difficult to make.

Myxomatous mitral valve diseased dogs sampled in the morning also had greater renal excretion of calcium and magnesium compared to MMVD-EG ones, while no difference in phosphate excretion was noted. In old experimental studies conducted on healthy dogs treated with intravenous furosemide, the urinary excretion of calcium and magnesium (reported as concentrations or as FE) was already found to be increased [27,28]. By decreasing the transepithelial voltage along the thin ascending loop of Henle's loop, furosemide is reported to decrease the absorption of calcium and magnesium at the tubular level in humans; thus, increasing the urinary excretion of these electrolytes [29]. There is insufficient literature to establish a link between furosemide and phosphate excretion according to the available human literature. To the best of the authors' knowledge, there are no studies correlating the response to furosemide with urinary

excretion of calcium, phosphate, and magnesium in dogs with heart disease. Our results might provide a basis for further studies aimed at a better understanding of the role of furosemide, MMVD, or even renal dysfunction in the excretion of these electrolytes in dogs.

Significant negative correlations were observed between most of the measured urinary electrolytes and the hours elapsed from the morning furosemide administration in the enrolled dogs. Although weak, such correlations further corroborate the main finding of our study in regard to the impact of the time from diuretic therapy and urine collection and analysis. On the contrary, neither the dose nor the duration of furosemide therapy was correlated with urinary analytes results. These findings could be partially supported by the basic pharmacokinetic principles of furosemide and its characteristic sigmoidal dose-response curve (threshold dose to start diuretic effect followed by ceiling or plateau effect). Moreover, the postdiuretic rebound effects, namely the “early” and “late braking phenomenon”, could help to explain, at least in part, the lack of correlation between urinary electrolytes results and treatment duration [30].

In the comparison of MMVD and healthy dogs, higher urinary electrolyte excretion (FENa, uNa:uCr, FECl, uCl:uCr, FENa:FEK, uNa:uK) was detected in MMVD-MG compared to H-MG, while no difference was documented between H-EG and MMVD-EG. Hence, the tubular reabsorption capacity of sodium and chloride is comparable between healthy dogs and dogs with stable MMVD ACVIM stage C, when analyzed more than six hours after the last diuretic administration. Although predictable based on the known pharmacokinetic of furosemide, such finding is important to be documented in general clinical practice, raising questions regarding the possibility of rebound sodium and water retention and renin-angiotensin-aldosterone system activation in response to

transient volume depletion once furosemide effect is ended, with additional implications regarding the optimal dosing interval for this drug.

Circadian fluctuations of urinary electrolytes have previously been observed in humans and animals [31]. In healthy dogs, a marked day/night variation in urinary excretion of sodium has been reported, with several studies describing an afternoon peak of sodium excretion four to eight hours after meal ingestion, followed by a progressive decrease during evening and night [32-34]. Despite the aforementioned studies, no information is currently available concerning circadian changes of urinary electrolytes in fasted dogs. To rule out the possible effect of such physiologic fluctuations, we included a group of healthy dogs, fasting for at least 12 hours, sampled in the morning or in the evening. Based on our results, the control group experienced no difference in urinary sodium, chloride, and potassium excretion based on the time of sampling, suggesting that in healthy dogs no significant morning vs evening variation in urinary electrolytes is expected. Therefore, it is possible to claim that the difference in electrolyte excretion in MMVD-MG vs. MMVD-EG dogs depends mainly, if not exclusively, on the time elapsed from furosemide administration.

Of note, [uNa], [uCl], and [uK] were significantly decreased in diseased dogs if compared to the healthy ones. Although as first unexpected, these results are not surprising since the reduction of urine concentration after furosemide treatment significantly affects urine chemistry [23], with a potential dilutional effect on urinary analytes. A dilutional effect was also confirmed by the significant decrease in urine specific gravity and [uCr] noticed in diseased dogs of both groups. Hence, the sole evaluation of the concentration of urinary electrolytes could lead to misinterpretation of the diuretic response. For these reasons, normalization with [uCr] ratio or even better,

the evaluation of the FE of the substance of interest is recommended in this type of patient.

The results of our study should be read in the context of certain limitations. First of all, the time windows of sample collections remained relatively wide (samples could be collected at a range of times between one and six hours for MMVD-MG or over six hours for MMVD-EG dogs, after furosemide administration). Possibly, such temporal variability could have led to an increased variability of urinary electrolyte excretion. Moreover, although MMVD and healthy dogs were sampled in the morning or in the evening based on the time of the appointment randomly arranged with the owner, the possibility of systematic sampling generating systematic differences between groups should be considered. However, it should be considered that our study was intentionally designed to be an observational investigation aimed to be as representative as possible of the clinical setting and schedules of many small animal clinical practices. For the same reason, and more importantly, urine volume quantification was not performed. This is a limitation of the study, since the interpretation of urinary electrolytes should be linked with the amount of urine volume excreted in a certain amount of time, and not only with the time elapsed from furosemide administration. Indeed, urinary volume and urinary sodium are not interchangeable measures and might not change in parallel (e.g., a patient under diuretics could excrete a significant amount of water with low sodium content and thus experience incomplete decongestion) [8]. Treatments and dosages were not standardized since they could vary based on the needs of the patients and the clinician's judgment. Nevertheless, there was no significant difference in terms of therapeutic regimens between the two groups of diseased dogs. Dietary sodium intake was not standardized, and this could have affected furosemide responsiveness and natriuresis in our populations. In a recent study involving healthy dogs that were fed

with normal, low, or ultralow sodium diets, even if there was a significant difference between the three groups, the authors did not specify whether the difference was assessed in fasting and fed patients. Furthermore, the samples collected shortly after a meal had the greatest fluctuation in FENa, while in fasted dogs FENa was more commonly less than 1% despite individual variations still being detectable [35]. The postprandial peak in urinary sodium excretion occurs after four to six hours and approximately 60% of the sodium fed is excreted within eight hours after food intake [36]. Although the time between feeding, diuretic administration, and sampling was inconsistent in enrolled dogs, such inconsistency involved both healthy and MMVD dogs, and the potential derived bias has been similarly distributed between groups. More importantly, at the time of sampling, enrolled dogs had all been fasted for at least 12 hours. We can therefore assume that although the lack of dietary standardization in this context remains an important limitation, its impact has been minimized. In addition, MMVD and healthy dogs were not matched for weight and age, especially due to the intrinsic nature of MMVD that commonly affects old, small-sized dogs. Aging, as well as obesity, have been documented as affecting renal hemodynamic and sodium handling in humans [37-39] and in some experimental animal models [40-41]. Nevertheless, studies considering variations of electrolyte excretion in dogs of different ages and weights are lacking. There are only few studies available, describing FE distribution in puppies up to six-months-old or comparing natriuresis between puppies and mature dogs [42,43]. For these reasons, the real impact of such physiological differences in the study groups could not be clearly estimated. Nonetheless, in order to partially overcome this limitation, we made further comparisons in urinary electrolytes (dogs > 6 years vs. dogs < 6 years; dogs > 20 kg vs. dogs < 20 kg) within the group of healthy dogs; no clinically significant difference was observed (Table C, available in Supplemental Material on-line). Lastly,

due to the high number of hypothesis tested and comparisons performed, the possibility of cumulative type I error should be acknowledged.

### **Conclusion**

This study demonstrates that urinary excretion of sodium, potassium, and chloride, as well as additional urinary electrolytes, is increased within six hours from furosemide administration in dogs with stable MMVD ACVIM stage C, compared to dogs sampled beyond six hours and healthy controls. Since no relevant morning vs. evening variations of urinary electrolytes were found in this study in healthy dogs, the difference in electrolyte excretion between the two time periods assessed in MMVD dogs treated with furosemide depends mainly, if not exclusively, on the time elapsed from furosemide administration to patient evaluation. The results of this study add new information concerning urinary electrolyte handling in dogs with MMVD receiving diuretic therapy, suggesting that urine chemistry interpretation is strongly affected by the timing of blood and urine sampling. This could have important implications in both clinical and research fields and could offer new perspectives in the identification of diuretic resistance in such patients.

### **References**

- [1] Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD, Fox PR, Häggström J, Fuentes VL, Oyama MA, Rush JE, Stepien R, Uechi M. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2019;33:1127-40.
- [2] Atkins CE, Häggström J. Pharmacologic management of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Cardiol* 2012;14:165–84.

- [3] Adin D, Taylor AW, Hill RC, Scott RC, Martin FG. Intermittent bolus injection versus continuous infusion of furosemide in normal adult greyhound dogs. *J Vet Intern Med* 2003;17:632–6.
- [4] Uechi M, Matsuoka M, Kuwajima E, Kaneko T, Yamashita K, Fukushima U, Ishikawa Y. The effects of the loop diuretics furosemide and torasemide on diuresis in dogs and cats. *J Vet Med Sci* 2003;65:1057–61.
- [5] Hori Y, Takusagawa F, Ikadai H, Uechi M, Hoshi F, Higuchi S. Effects of oral administration of furosemide and torsemide in healthy dogs. *Am J Vet Res* 2007;68:1058–63.
- [6] Hori Y, Ohshima N, Kanai K, Hoshi F, Itoh N, Higuchi S. Differences in the duration of diuretic effects and impact on the renin–angiotensin–aldosterone system of furosemide in healthy dogs. *J Vet Med Sci* 2010;72:13–8.
- [7] Harada K, Ukai Y, Kanakubo K, Yamano S, Lee J, Kurosawa TA, Uechi M. Comparison of the diuretic effect of furosemide by different methods of administration in healthy dogs. *J Vet Emerg Crit Care* 2015;25:364–71.
- [8] Loughran KA, Larouche-Lebel É, Huh T, Testani JM, Rao VS, Oyama MA. Prediction and measurement of diuretic responsiveness after oral administration of furosemide to healthy dogs and dogs with congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2020;34:2253–64.
- [9] El-Sayed MG, Atef M, El-Gendi AY, Youssef SA. Disposition kinetics of furosemide in dogs. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1981;253:4–10.
- [10] Ali SS, Olinger CC, Sobotka PA, Dahle TG, Bunte MC, Blake D, Boyle AJ. Loop diuretics can cause clinical natriuretic failure: a prescription for volume expansion. *Congest Heart Fail* 2009;15:1–4.

- [11] Testani JM, Hanberg JS, Cheng S, Rao V, Onyebeke C, Laur O, Kula A, Chen M, Wilson FT, Darlington A, Bellumkonda L, Jacoby D, Tang WH, Parikh CR. Rapid and highly accurate prediction of poor loop diuretic natriuretic response in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 2016;9:1-18.
- [12] Biegus J, Zymlński R, Sokolski M, Todd J, Cotter G, Metra M, Jankowska EA, Banasiak W, Ponikowski P. Serial assessment of spot urine sodium predicts effectiveness of decongestion and outcome in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 2019;21:624–33.
- [13] Martens P, Dupont M, Verbrugge FH, Damman K, Degryse N, Nijst P, Reynders C, Penders J, Tang WHW, Testani J, Mullens W. Urinary sodium profiling in chronic heart failure to detect development of acute decompensated heart failure. *JACC Heart Fail* 2019;7:404–14.
- [14] Verbrugge FH. Utility of urine biomarkers and electrolytes for the management of heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2019;16:240–9.
- [15] Damman K, Ter Maaten JM, Coster JE, Krikken JA, van Deursen VM, Krijnen HK, Hofman M, Nieuwland W, van Veldhuisen DJ, Voors AA, van der Meer P. Clinical importance of urinary sodium excretion in acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 2020;22:1438–47.
- [16] Adin D, Kurtz, Atkins C, Papich MG, Vaden S. Role of concentration and renin–angiotensin–aldosterone activation in the staging of canine heart disease. *J Vet Intern Med* 2019;34:53–64.
- [17] Zazzeron L, Ottolina D, Scotti E, Ferrari M, Bruzzone P, Sibilla S, Mareghi C, Gattinoni L, Caironi P. Real-time urinary electrolyte monitoring after furosemide administration in surgical ICU patients with normal renal function. *Ann Intensive Care* 2016;6:1-10

- [18] Troia R, Gruarin M, Grisetti C, Serafini F, Magna L, Monari E, Giunti M, Dondi F. Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: diagnostic and prognostic implications. *J Vet Intern Med* 2018;32:1372–82.
- [19] Brandish PE, Chen H, Szczerba P, Hershey JC. Development of a simplified assay for determination of the antimineralocorticoid activity of compounds dosed in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2008;57:155–60.
- [20] Eudy RJ, Sahasrabudhe V, Sweeney K, Tugnait M, King-Ahmad A, Near K, Loria P, Banker ME, Piotrowski DW, Boustany-Kari CM. The use of plasma aldosterone and urinary sodium to potassium ratio as translatable quantitative biomarkers of mineralocorticoid receptor antagonism. *J Transl Med* 2011;9:1–11.
- [21] Doering A, Jenkins CA, Storrow AB, Lindefeld J, Fermann GJ, Miller KF, Sperling M, Collins SP. Markers of diuretic resistance in emergency department patients with acute heart failure. *Int J Emerg Med* 2017;10:1-7.
- [22] Collins SP, Jenkins CA, Baughman A, Miller KF, Storrow AB, Han JH, Brown NJ, Liu D, Luther JM, McNaughton CD, Self WH, Peng D, Testani JM, Lindenfeld J. Early urine electrolyte patterns in patients with acute heart failure. *Heart Fail* 2019;6:80–8.
- [23] Adin D, Atkins C, Papich M. Pharmacodynamic assessment of diuretic efficacy and braking in a furosemide continuous infusion model. *J Vet Cardiol* 2018;20:92–101.
- [24] Hoorn EJ, Ellison DH. Diuretic resistance. *Am J Kidney Dis* 2017;69:136–42.
- [25] Shah N, Madanieh R, Alkan M, Dogar MU, Kosmas CE, Vittorio TJ. A perspective on diuretic resistance in chronic congestive heart failure. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2017;11:271–8.

- [26] ter Maaten JM, Valente MAE, Metra M, Bruno N, O'Connor CM, Ponikowski P, Teerlink JR, Cotter G, Davison B, Cleland JG, Givertz MM, Bloomfield DM, Dittrich HC, van Veldhuisen DJ, Hillege HL, Damman K, Voors AA. A combined clinical and biomarker approach to predict diuretic response in acute heart failure. *Clin Res Cardiol* 2016;105:145–53.
- [27] Duarte CG. Effects of ethacrynic acid and furosemide on urinary calcium, phosphate and magnesium. *Metabolism* 1968; 17:867–76.
- [28] White MG, Van Gelder J, Eastes G. The effect of loop diuretics on the excretion of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Cl<sup>-</sup>. *J Clin Pharmacol* 1981;21:610–4.
- [29] Alexander RT, Dimke H. Effect of diuretics on renal tubular transport of calcium and magnesium. *Am J Physiol Renal* 2017;312:998–1015.
- [30] Regolisti G, Antoniotti R, Pastorini G, Fani F, Fiaccadori E. Management of congestion and diuretic resistance in heart failure. *Nephrology@ Point of Care* 2016;2:73-87.
- [31] Lefebvre HP, Dossin O, Trumel C, Braun JP. Fractional excretion tests: a critical review of methods and applications in domestic animals. *Vet Clin Pathol* 2008;37:4–20.
- [32] Gordon CR, Lavie P. Day–night variations in urine excretions and hormones in dogs: role of autonomic innervation. *Physiol Behav* 1985;35:175–81.
- [33] Boemke W, Palm U, Mohnhaupt R, Corea M, Seeliger E, Reinhardt HW. Influence of captopril on 24-hour balances and the diurnal patterns of urinary output, blood pressure, aldosterone and atrial natriuretic peptide in conscious dogs. *Ren Physiol Biochem* 1995;18:35–48.
- [34] Mochel JP, Fink M, Peyrou M, Desevaux C, Deurinck M, Giraudel JM, Danhof M. Chronobiology of the renin–angiotensin–aldosterone system in dogs: relation to blood pressure and renal physiology. *Chronobiol Int* 2013;30:1144–59.

- [35] Lobetti RG. Urinary fractional clearance of sodium in 8 healthy Beagle dogs fed normal, low, or ultralow sodium diets. *Vet Med Int* 2020;2020:1-5.
- [36] Reinhardt HW, Seeliger E, Lohmann K, Corea M, Boemke W. Changes of blood pressure, sodium excretion and sodium balance due to variations of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Auton Nerv Syst* 1996;57:184-7
- [37] Epstein M. Aging and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:1106-22.
- [38] Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension* 2003;41:625-33.
- [39] Esposito C, Dal Canton A. Functional changes in the aging kidney. *J Nephrol* 2010;23 Suppl 15:41-5.
- [40] Friedman SM, Friedman CL. Salt and water balance in aging rats. *Gerontologia* 1957;1:107-21.
- [41] Vargas F, Ortiz MC, Fortepiani LA, Atucha NM, Garcia-Estan J. Age-related changes in the pressure diuresis and natriuresis response. *Am J Physiol* 1997;273:578-82.
- [42] Lane IF, Shaw DH, Burton SA, Donald AW. Quantitative urinalysis in healthy Beagle puppies from 9 to 27 weeks of age. *Am J Vet Res* 2000;5:577-81.
- [43] Laroute V, Chetboul V, Roche L, Maurey C, Costes G, Pouchelon JL, De La Farge F, Boussouf M, Lefebvre HP. Quantitative evaluation of renal function in healthy Beagle puppies and mature dogs. *Res Vet Sci* 2015;2:161-7.

#### Footnotes

c AU 480, Olympus/Beckman Coulter, Brea, California, USA

d American Optical, Buffalo, NY, USA

e Combur-Test® 10 UX, Roche, Switzerland

f URISYS 1100, Roche, Switzerland

g MedCalc Statistical Software version 18.10.2; Ostend, Belgium

## Figure Legend

Figure 1. Dot plot showing results of fractional excretion of sodium in dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the morning (n = 47) and in the evening (n = 26) (red dots) vs. healthy dogs sampled in the morning (n = 56) and in the evening (n = 50) (blue dots). Upright bars represent minimum and maximum values, while horizontal lines (central bars) represent median value. Each comparison was made using a Mann-Whitney test without correction for multiple testing. P values are reported for significantly different results ( $P < 0.05$ ).

FENa: fractional excretion of sodium; H-EG: healthy dogs evaluated in the evening (healthy evening group); H-MG: healthy dogs evaluated in the morning (healthy morning group); MMVD-MG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the morning; MMVD-EG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the evening.

Figure 2. Dot plot showing results of fractional excretion of chloride in dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the morning (n = 47) and in the evening (n = 26) (red dots) vs. healthy dogs sampled in the morning (n = 56) and in the evening (n = 50) (blue dots). Upright bars represent minimum and maximum values, while horizontal lines (central bars) represent median value. Each comparison was made using a Mann-Whitney test without correction for multiple testing. P values are reported for significantly different results ( $P < 0.05$ ).

FECl: fractional excretion of chloride; H-EG: healthy dogs evaluated in the evening (healthy evening group); H-MG: healthy dogs evaluated in the morning (healthy morning group); MMVD-MG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in

the morning; MMVD-EG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the evening.

Figure 3. Dot plot showing results of urine sodium to urine potassium ratio in dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the morning (n = 47) and in the evening (n = 26) (red dots) vs. healthy dogs sampled in the morning (n = 56) and in the evening (n = 50) (blue dots). Upright bars represent minimum and maximum values, while horizontal lines (central bars) represent median value. Each comparison was made using a Mann-Whitney test without correction for multiple testing. P values are reported for significantly different results (P<0.05).

uNa:uK: urine sodium to potassium ratio; H-EG: healthy dogs evaluated in the evening (healthy evening group); H-MG: healthy dogs evaluated in the morning (healthy morning group); MMVD-MG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the morning; MMVD-EG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the evening.

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;FIGURE 1.tif](#)

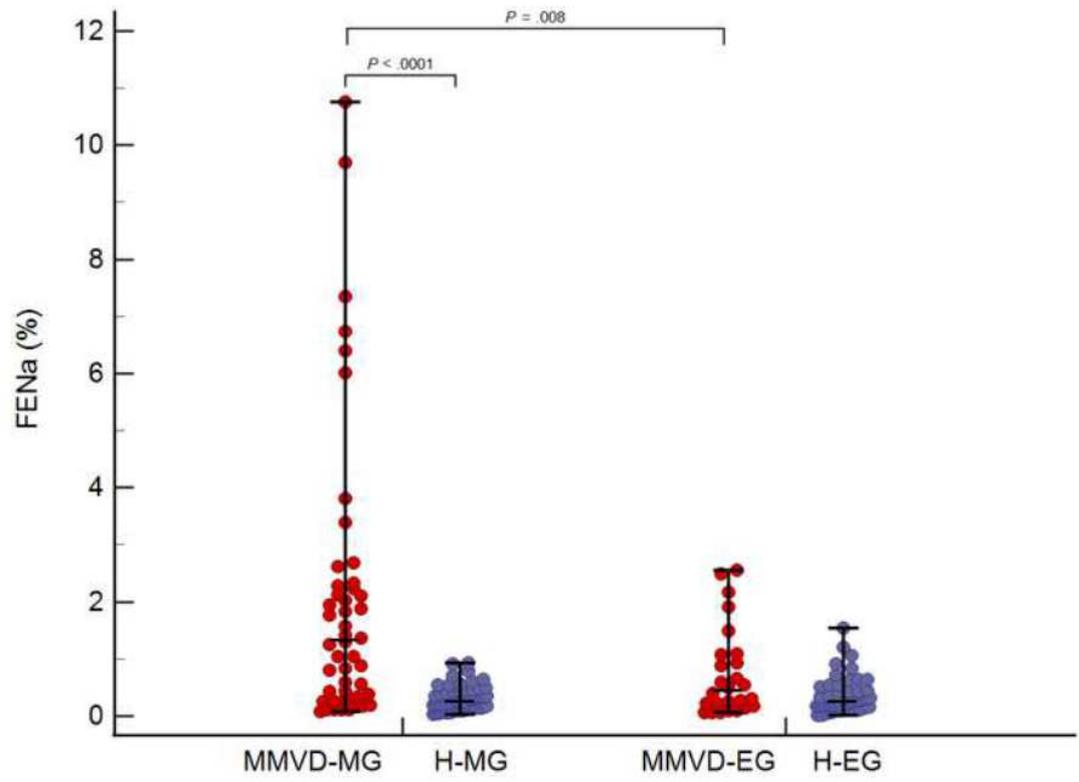
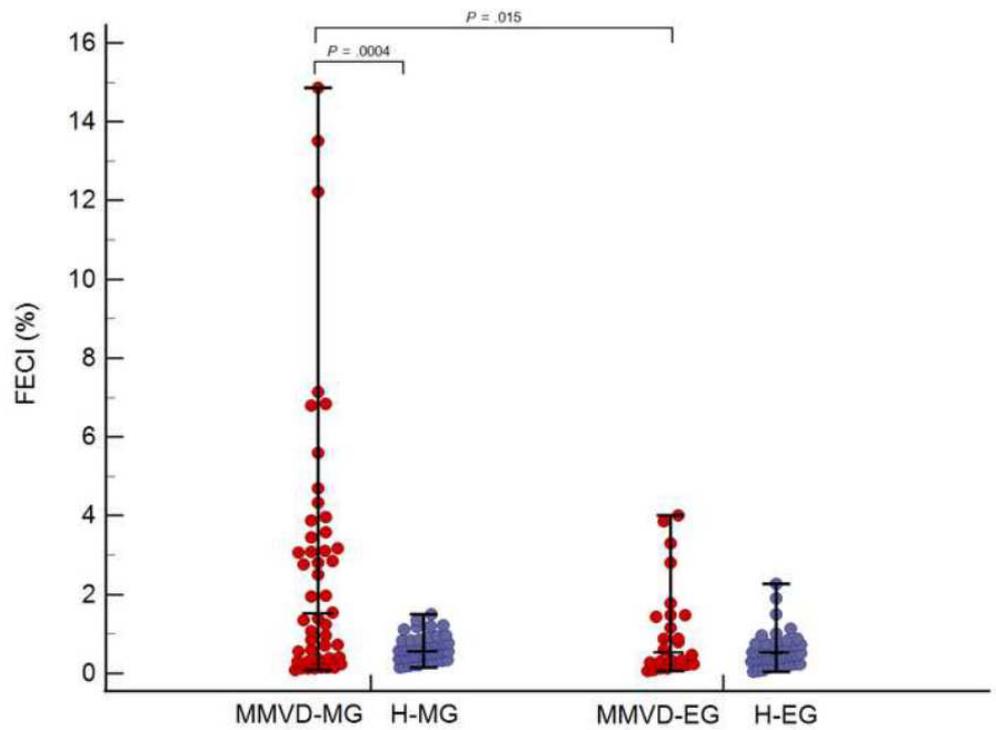
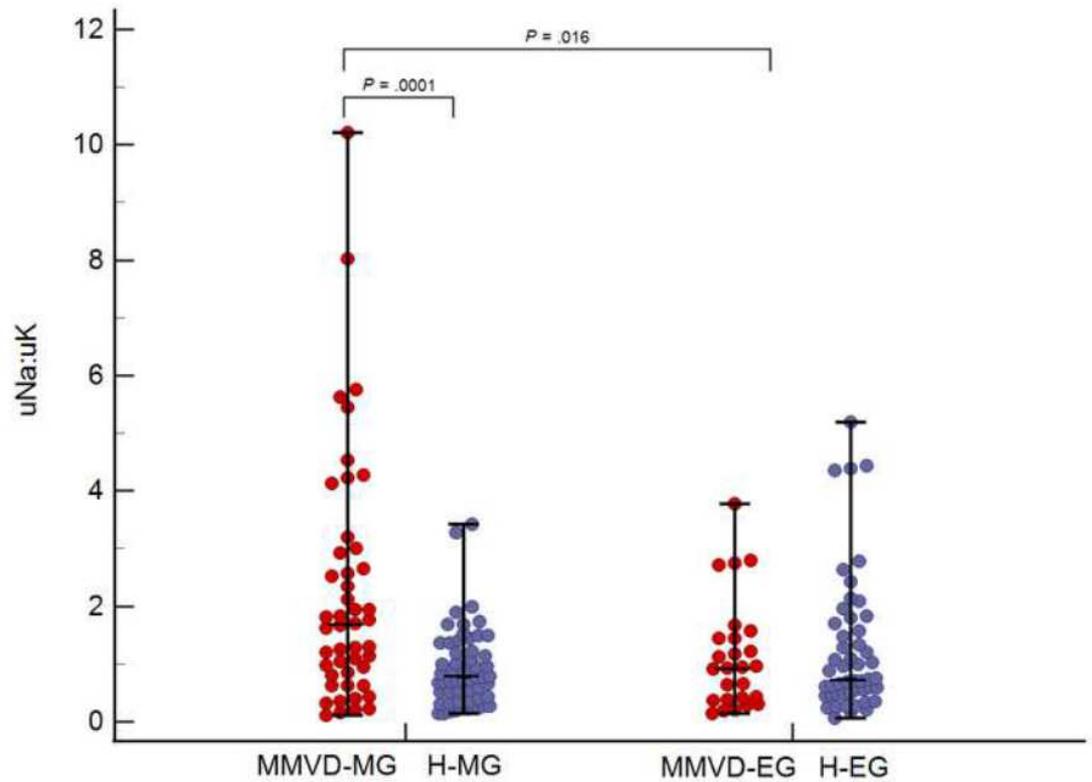


Figure 2

[Click here to access/download;Figure;FIGURE 2.tif](#)





Table

[Click here to access/download;Table;2022Table 1.docx](#)

1

**Table 1.** Demographic data and descriptive statistics of the study population: dogs with myxomatous mitral valve disease (MMVD) sampled in the morning (MMVD-MG) and in the evening (MMVD-EG), and between healthy control dogs sampled in the morning (H-MG) and in the evening (H-EG). Data were reported as median and range (minimum–maximum value) or mean  $\pm$  standard deviation (SD), based on their distribution. ACEI: angiotensin converting enzyme inhibitor; MMVD: myxomatous mitral valve disease; H-EG: healthy dogs evaluated in the evening (healthy evening group); H-MG: healthy dogs evaluated in the morning (healthy morning group); MMVD-MG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the morning; MMVD-EG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the evening.

Population	MMVD-MG (n =47)	MMVD-EG (n=26)	P value	H-MG (n = 56)	H-EG (n=50)	P value
Age (years)	12 (6-16)	12.5 (8-16)	0.88	3.9 (1-10)	2.5 (1-7.3)	0.005
Weight (kg)	7.4 (2.6-18.5)	7.5 (3.2-19)	0.6	19 (3-63)	26 (5-78)	0.005
Medications						
Furosemide (mg/kg/day)	4 (1.1-8)	4 $\pm$ 1.41	0.38			
Time from morning furosemide administration (hours)	4 (2-6)	9 (7-11)	< 0.0001			

Pimobendan (mg/kg/day)	0.5 (0.3–0.9)	0.5 (0.3-1)	0.91			
N. of dogs receiving Spironolactone	11/47	9/26	0.41			
Spironolactone (mg/kg/day)	2.1±0.38	2.1 (1.8-2.8)	0.84			
N. of dogs receiving ACEI	38/47	25/26	0.08			
ACEI (mg/kg/day)	0.7 (0.2–1.4)	0.6 (0.2-1.6)	0.29			
N. of dogs receiving Benazepril	37/47	23/26				
Benazepril (mg/kg/day)	0.7 (0.2-1.4)	0.6 (0.2-1.1)	0.21			
N. of dogs receiving Enalapril	1/47	2/26				
Enalapril (mg/kg/day)	0.8	0.75 (0.7-0.8)	0.47			

1

**Table 2.** Data comparison between dogs with myxomatous mitral valve disease (MMVD) sampled in the morning (MMVD-MG) and in the evening (MMVD-EG), and between healthy control dogs sampled in the morning (H-MG) and in the evening (H-EG). Data are reported as mean ± standard deviation (SD) or median and range (minimum–maximum value), based on their distribution. FECa: fractional excretion of total calcium; FECl: fractional excretion of chloride; FEK: fractional excretion of potassium; FEMg: fractional excretion of magnesium; FENa: fractional excretion of sodium; FENa:FEK: fractional excretion of sodium to fractional excretion of potassium ratio; FEP: fractional excretion of phosphate; H-EG: healthy dogs evaluated in the evening (healthy evening group); H-MG: healthy dogs evaluated in the morning (healthy morning group); Mg: Magnesium; MMVD-MG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the morning; MMVD-EG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the evening; RI: Reference interval; [uCa]: urine calcium; uCa:uCr: urine calcium to urine creatinine ratio; [uCl]: urine chloride; uCl:uCr: urine chloride to urine creatinine ratio; [uCr]: urine creatinine; [uK]: urine potassium; uK:uCr: urine potassium to urine creatinine ratio; uMg: urine magnesium; uMg:uCr: urine magnesium to urine creatinine ratio; [uNa]: urine sodium; uNa:uCr: urine sodium to urine creatinine ratio; uNa:uK: urine sodium to urine potassium ratio; [uP]: urine phosphate; uP:uCr: urine phosphate to urine creatinine ratio; UPC: urine protein to urine creatinine ratio; USG: urine specific gravity.

Variable	RI	MMVD-MG (n=47)	MMVD-EG (n=26)	P value	H-MG (n=56)	H-EG (n=50)	P value
Creatinine (mg/dL)	0.75–1.4	1.2 (0.72–2.45) <sup>a</sup>	1.3±0.41 <sup>po</sup>	0.330	1.09±0.20	1.12±0.17	0.336
Urea (mg/dL)	17–48	75.2 (33.1–221) <sup>aa</sup>	68.7 (34–189) <sup>po</sup>	0.454	33.99±8.5	33.3±7.9	0.679
Phosphate (mg/dL)	2.65–5.40	3.7±1.1	3.8±0.87	0.657	4.08±0.72	4.05±0.65	0.773
Albumin (g/dL)	2.75–3.85	3.3±0.4	3.1±0.33	0.03	3.28±0.29	3.27±0.22	0.808
Total protein (g/dL)	5.6–7.30	6.7 (3.9–8)	6.6 (5.1–7.3)	0.254	6.45±0.47	6.41±0.40	0.845
Calcium (mg/dL)	9.3–11	10.56±0.69 <sup>aa</sup>	10.35±0.63	0.224	10±0.37	10.1±0.45	0.056
Sodium (mEq/L)	143–151	148.29±3.71 <sup>a</sup>	147 (112–153)	0.302	147 (144–152)	147 (139–150)	0.162
Potassium (mEq/L)	3.8–5.0	4.28±0.43 <sup>a</sup>	4.31±0.39	0.302	4.4±0.27	4.38±0.29	0.290
Chloride (mEq/L)	108.0–118	117±3.65 <sup>aa</sup>	107.2 (82.2–111) <sup>po</sup>	0.708	113.3±1.9	112.9±2.6	0.418
Mg (mg/dL)	1.70–2.35	1.99±0.35	2.01±0.32	0.781	2.08±0.17	2.01±0.130	0.015
USG	>1030	1014 (1006–1036) <sup>aa</sup>	1018 (1006– 1041) <sup>po</sup>	0.162	1049±13.9	1047±13.9	0.581
UPC (mg/mg)	0–0.5	0.2 (0.1–1.3) <sup>aa</sup>	0.15 (0.08–0.61) <sup>po</sup>	0.015	0.1 (0.05–0.3)	0.1 (0.049–0.3)	0.192
[uCr] (mg/dL)		48.6 (8.9–176.6) <sup>aa</sup>	78.2±44.76 <sup>po</sup>	0.01	293.5±88.4	327±102.6	0.073
[uNa] (mEq/L)		71.1 (5.9–192.9) <sup>aa</sup>	36.3 (4.6–103.9) <sup>po</sup>	0.021	94.3 (11.7– 342.4)	106 (5.8–344.8)	0.547
[uCl] (mEq/L)		68.2 (6–148.1) <sup>aa</sup>	32.5 (5–114.8) <sup>po</sup>	0.038	184.26±84.95	168.16±85.16	0.332

[uK] (mEq/L)		38.9 (7.9–157.1) <sup>aa</sup>	41.5±17.71 <sup>po</sup>	0.596	133.9 (31.5– 378.6)	124.4 (32.3–256.9)	0.484
[uCa] (mg/dL)		6.27±3.45 <sup>a</sup>	4.59±2.61	0.048	3.9 (1.7–1.3)	3.55 (1–13.4)	0.387
[uMg] (mg/dL)		4.53 (0.85–13.3) <sup>aa</sup>	4.92 (0.87–11.2) <sup>po</sup>	0.903	13.05±0.05	11.1±6.0	0.148
[uP] (mg/dL)		34 (0.2–222) <sup>aa</sup>	53.35 (18.4– 197.2) <sup>po</sup>	0.070	181.26±70.05	159±81.78	0.135
uNa:uK		1.67 (0.11–10.21) <sup>aa</sup>	0.93 (0.14–3.77)	0.016	0.75 (0.13–3.4)	0.75 (0.07–5.19)	0.299
uNa:uCr	0.00–1.00	1.63 (0.09–12) <sup>aa</sup>	0.50 (0.06–2.82)	0.003	0.35 (0.03–1.78)	0.31 (0.01–2.3)	0.859
uCl:uCr	0.00–1.25	1.51 (0.09–14.7) <sup>aa</sup>	0.44 (0.06–2.99)	0.008	0.66 (0.17–2.14)	0.49 (0.057–2.57)	0.132
uK:uCr	0.00–0.80	0.86 (0.25–5.1) <sup>aa</sup>	0.59 (0.18–1.37) <sup>po</sup>	0.016	0.48 (0.13–1.5)	0.36 (0.07–1.1)	0.089
uMg:uCr	0.000–0.08	0.11 (0.019–0.54) <sup>aa</sup>	0.056 (0.01–0.34) <sup>po</sup>	0.006	0.04 (0.006– 0.14)	0.035±0.021	0.025
uCa:uCr	0.00–0.03	0.13 (0.01–0.69) <sup>aa</sup>	0.06 (0.007–0.36) <sup>po</sup>	0.001	0.014 (0.005– 0.07)	0.01 (0.003–0.07)	0.119
uP:uCr	0.00–0.97	1.02±0.66 <sup>aa</sup>	0.89 (0.37–2.3) <sup>po</sup>	0.070	0.59 (0.17–1.36)	0.47 (0.006–1.43)	0.001
FENa:FEK		0.05 (0.004–0.24) <sup>aa</sup>	0.03 (0.004–0.1)	0.017	0.02 (0.00–0.09)	0.02 (0.00–0.15)	0.260
FENa (%)	0.00–0.69	1.3 (0.08–10.7) <sup>aa</sup>	0.45 (0.06–2.5)	0.008	0.25 (0.03–0.94)	0.25 (0.01–1.55)	0.730
FECl (%)	0.00–1.09	1.54 (0.08–14.8) <sup>aa</sup>	0.53 (0.07–4)	0.015	0.56 (0.15–1.5)	0.48 (0.05–2.28)	0.214
FEK (%)	2.3–23.8	26.4 (8.1–93.8) <sup>aa</sup>	17.38 (6.9–49.4) <sup>po</sup>	0.035	11.26 (4.27– 45.2)	10.52±4.04	0.240

FEMg (%)	0–4	7.1 (1.05–22.5) <sup>aa</sup>	4.4 (0.4–20.9) <sup>bb</sup>	0.036	2.43±1.1	2.02±1.2	0.105
FECa (%)	0.00–0.33	1.6 (0.1–6.8) <sup>aa</sup>	0.7 (0.07–5.2) <sup>bb</sup>	0.005	0.17 (0.05–0.64)	0.12 (0.03–0.66)	0.081
FEP (%)	2.22–27.2	35.5±21.1 <sup>aa</sup>	34.04±18.6 <sup>bb</sup>	0.835	16.2 (6.07–46.5)	12.6 ±6.84	0.035

<sup>a</sup> Significantly different with P<0.05 between MMVD-MG vs. H-MG

<sup>aa</sup> Significantly different with P<0.01 between MMVD-MG vs. H-MG

<sup>bb</sup> Significantly different with P<0.01 between MMVG-EG vs. H-EG

**(Supplemental Material) Table A.** Urinary electrolytes comparison between dogs with myxomatous mitral valve disease (MMVD) sampled in the morning (MMVD-MG) receiving RAAS inhibitors (ACEI and/or Spironolactone) and not receiving RAAS inhibitors (ACEI and/or Spironolactone). Data are reported as mean ± standard deviation (SD) or median and range (minimum–maximum value); based on their distribution. ACEI: angiotensin converting enzyme inhibitor; FECa: fractional excretion of total calcium; FEC: fractional excretion of chloride; FEK: fractional excretion of potassium; FEMg: fractional excretion of magnesium; FENa: fractional excretion of sodium; FENa:FEK: fractional excretion of sodium to fractional excretion of potassium ratio; FEP: fractional excretion of phosphate; MMVD-MG: dogs with myxomatous mitral valve disease sampled in the morning; RI: Reference interval; uCa: urine calcium; uCa:uCr: urine calcium to urine creatinine ratio; uCl: urine chloride; uCl:uCr: urine chloride to urine creatinine ratio; uCr: urine creatinine; uK: urine potassium; uK:uCr: urine potassium to urine creatinine ratio; uMg: urine magnesium; uMg:uCr: urine magnesium to urine creatinine ratio; uNa: urine sodium; uNa:uCr: urine sodium to urine creatinine ratio; uNa:uK: urine sodium to urine potassium ratio; uP: urine phosphate; uP:uCr: urine phosphate to urine creatinine ratio.

**(Supplemental Material) Table B.** Correlation results between time from morning furosemide administration (hours), time from furosemide treatment date (days), dose of furosemide therapy (mg/kg/day) and urinary electrolytes in 73 dogs with myxomatous mitral valve disease (MMVD). Correlation was assessed using Pearson r or Spearman rank correlation, based on data distribution. Data were reported as correlation coefficient and statistical significance (P-value).  $FECa$ : fractional excretion of total calcium;  $FECI$ : fractional excretion of chloride;  $FEK$ : fractional excretion of potassium;  $FEMg$ : fractional excretion of magnesium;  $FENa$ : fractional excretion of sodium;  $FENa:FEK$ : fractional excretion of sodium to fractional excretion of potassium ratio;  $FEP$ : fractional excretion of phosphate;  $[uCa]$ : urine calcium;  $uCa:uCr$ : urine calcium to urine creatinine ratio;  $[uCl]$ : urine chloride;  $uCl:uCr$ : urine chloride to urine creatinine ratio;  $[uCr]$ : urine creatinine;  $[uK]$ : urine potassium;  $uK:uCr$ : urine potassium to urine creatinine ratio;  $[uMg]$ : urine magnesium;  $uMg:uCr$ : urine magnesium to urine creatinine ratio;  $[uNa]$ : urine sodium;  $uNa:uCr$ : urine sodium to urine creatinine ratio;  $uNa:uK$ : urine sodium to urine potassium ratio;  $[uP]$ : urine phosphate;  $uP:uCr$ : urine phosphate to urine creatinine ratio.

	Time from morning furosemide administration (hours)	Time from treatment date (days)	Dose of furosemide therapy (mg/kg/day)
$[uCr]$ (mg/dL)	0.29 (P=0.01)	0.110 (P=0.35)	-0.23 (P=0.049)
$[uNa]$ (mEq/L)	-0.2 (P=0.08)	-0.02 (P=0.86)	-0.199 (P=0.09)
$[uCl]$ (mEq/L)	-0.14 (P=0.21)	0.02 (P=0.8)	-0.164 (P=0.16)

**(Supplemental Material) Table C.** Urinary electrolytes comparison between Healthy dogs with age < 6 years and > 6 years, and between Healthy dogs with body weight < 20 kg and > 20 kg. Data are reported as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median range (minimum-maximum value), based on their distribution.  $FECa$ , fractional excretion of total calcium;  $FECI$ , fractional excretion of chloride;  $FEK$ , fractional excretion of potassium;  $FEMg$ , fractional excretion of magnesium;  $FENa$ , fractional excretion of sodium;  $FENa:FEK$ , fractional excretion of sodium to fractional excretion of potassium ratio;  $FEP$ , fractional excretion of phosphate;  $RI$ : reference interval;  $[uCa]$ , urine calcium;  $uCa:uCr$ , urine calcium to urine creatinine ratio;  $[uCl]$ , urine chloride;  $uCl:uCr$ , urine chloride to urine creatinine ratio;  $[uCr]$ , urine creatinine;  $[uK]$ , urine potassium;  $uK:uCr$ , urine potassium to urine creatinine ratio;  $[uMg]$ , urine magnesium;  $uMg:uCr$  urine magnesium to urine creatinine ratio;  $[uNa]$ , urine sodium;  $uNa:uCr$ , urine sodium to urine creatinine ratio;  $uNa:uK$ , urine sodium to urine potassium ratio;  $[uP]$ , urine phosphate;  $uP:uCr$ , urine phosphate to urine creatinine ratio.

Variable	RI	Healthy dogs <6 years n=85	Healthy dogs >6 years n=21	P value	Healthy dogs <20 kg n=44	Healthy dogs >20 kg n=62	P value
$[uCr]$ (mg/dL)		312.7 $\pm$ 96.9	295.5 $\pm$ 95.41	0.46	297.9 $\pm$ 79.42	317 $\pm$ 106	0.3
$[uNa]$ (mEq/L)		117 (5.8-342)	80 (18-344)	0.18	139.9 (5.8-342.4)	88.5 (9.2-344.8)	0.11
$[uCl]$ (mEq/L)		180 $\pm$ 84.81	163 $\pm$ 86.64	0.41	196.74 $\pm$ 87.58	162.4 $\pm$ 80.88	0.04
$[uK]$ (mEq/L)		142.38 $\pm$ 62.26	108 (31-378.6)	0.05	135.3 (32-378.6)	127.4 $\pm$ 56.14	0.12
$[uCa]$ (mg/dL)		3.4 (1-12)	4.5 (1.4-17)	0.11	5.45 (1.1-17)	3.1 (1-12)	0.01

## **6. PROSPETTIVE DI STUDI FUTURI SULLA SINDROME CARDIO RENALE E RESISTENZA AI DIURETICI**

La sindrome cardiorenale, deriva da un'elaborata interazione di processi fisiopatologici che alimentano un circolo vizioso di insufficienza cardiaca e renale associate, con una prognosi molto sfavorevole. Dal punto di vista dello scompenso cardiaco, i principali meccanismi di che contribuiscono sono la scarsa perfusione renale e pressione venosa centrale aumentata. Questi meccanismi dovrebbero quindi essere i principali obiettivi per la terapia.

I biomarker possono fornire informazioni sui meccanismi fisiopatologici, inclusi i nuovi marcatori di danno tubulare che possono predire il peggioramento renale (worsening renal function-WFR) e l'outcome anche quando GFR è ancora inalterato (Damman 2011).

Questi i marker sembrano essere centrali nella fisiopatologia del coinvolgimento renale nell'insufficienza cardiaca. Indicano la presenza di danno tubulointerstiziale nella sindrome cardiorenale, che può svilupparsi come conseguenza della diminuzione della perfusione e aumento della congestione anche in presenza di GFR normale. Gli studi sulle malattie renali, inoltre, hanno dimostrato che questi i marcatori urinari riflettono il miglioramento del danno intrarenale dopo intervento terapeutico nefroprotettivo con blocco del RAAS (Kramer et al.; 2009; Waanders et al.;2009).

Con la loro elevata sensibilità e specificità, quindi, nuovi studi può utilizzare questi marker, comprese le frazioni di escrezione degli elettroliti, potranno essere utilizzati per la diagnosi precoce del danno tubolare e la valutazione degli effetti del trattamento.

Sono necessari studi futuri per chiarire ulteriormente la fisiopatologia di questa sindrome, compreso il fenotipo variabile, l'uso di nuovi marker e potenziali bersagli per trattamenti basati sull'evidenza.

Un altro studio che potrebbe essere interessante da elaborare è in merito al tasso di escrezione urinaria di albumina. In situazioni fisiologiche, passano piccole quantità di albumina attraverso la membrana glomerulare, ma solo una frazione di questa viene ritrovata nelle urine (Hillege et al.;2002). Questo è il risultato di un riassorbimento tubulare quasi completo di queste piccole quantità di proteine. Tuttavia, in condizioni fisiopatologiche, appaiono nelle urine quantità maggiori che vanno dalla microalbuminuria all'albuminuria franca. L'albuminuria è stata solo di recente accuratamente studiata nello scompenso cardiaco cronico in medicina umana (Van de Wal et al.; 2005; Smilde et al.; 2009.) In studi del Gruppo Italiano Per Lo Studio Della Sopravvivenza nell'infarto dell'insufficienza cardiaca miocardica (GISSI-HF) e nella valutazione della riduzione dello scompenso cardiaco mortalità e morbilità (Candesartan Heart Failure Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity CHARM), lo studio dell'albuminuria è non solo per i risultati prevalenti ma anche per predire l'outcome in questi pazienti la comprensione della fisiopatologia dell'albuminuria nello scompenso cardiaco è scarsa. In queste condizioni, si ritiene che l'albuminuria sia correlata alla disfunzione endoteliale, infiammazione e, più recentemente, al danno del glicocalice endoteliale (Stehouwer et al.;2004; Singh et al 2011).

È importante sottolineare che un grande contributo allo sviluppo di albuminuria in queste condizioni, è attribuito a pressioni glomerulari più elevate. (Imanishi et al 1999), Tuttavia, nello scompenso cardiaco, vi è un notevole aumento dell'escrezione urinaria di albumina che si riscontra maggiormente nei pazienti con scompenso cardiaco avanzato e successiva riduzione della perfusione renale (Smilde et al.; 2009). In effetti, questi pazienti hanno una frazione di filtrazione ridotta, il che potrebbe suggerire che la pressione glomerulare è bassa anziché alta (Damman et al.;2011). Pertanto, altri meccanismi possono essere responsabili dell'escrezione dell'albumina nell'insufficienza cardiaca, inclusa la mancanza di riassorbimento tubulare a causa dell'ischemia tubulare (Pollock et al 2007).

L'albuminuria non è solo un marker di integrità glomerulare ma anche di danno tubulare. Ciò potrebbe dar vita ad un circolo vizioso quale escrezione di albumina innescata dal danno tubulare ischemico e dall'albumina stessa, dallo *shear stress* (*stress da sollecitazione o stress meccanico*) che porta ad un ulteriore progressione del danno tubulare.

Infine, ci sono indicazioni che nella sindrome cardiorenale, non solo la diminuzione della perfusione ma anche l'aumentata pressione venosa, possono contribuire allo sviluppo dell'albuminuria, questa è un punto importante, alla luce delle recenti osservazioni sulla relazione tra pressione venosa centrale e GFR (Wegria et al 1955). Pertanto, l'albuminuria può essere un marker precoce di integrità glomerulare o di danno tubulare nello scompenso cardiaco che vale la pena di indagare anche in medicina veterinaria.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abdulkader RCR, Silva MV. The kidney and leptospirosis. *Pediatr Nephrol* 2008; 23(12):2111–2120.
2. Aghel A, Shrestha K, Mullens W, et al: Serum neutrophil gelatinase–associated lipocalin (NGAL) in predicting worsening renal function in acute decompensated heart failure. *J Card Fail* 2010;16:49-54
3. Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, et al. ACVIM Consensus Statement Guidelines for diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med.* 2009;23(1):1142-1150
4. Adin D, Kurtz K, Atkins C, Papich MG2, Vaden S. Role of electrolyte concentrations and renin-angiotensin-aldosterone activation in the staging of canine heart disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2019, 53-64.
5. Allen AE., Buckley GJ, Schaer M. Successful treatment of severe hypokalemia in a dog with acute kidney injury caused by leptospirosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 26(6) 2016; pp 837–843.
6. Andrade L, Rodrigues AC Jr, Sanches TR, et al Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. *Am J Physiol renal Physiol* 2007; 292:586–592.
7. Basile DP, Anderson MD et al: Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Compr Physiol.* 2012 April; 2(2):1303–1353.
8. Bazzi C, Petrini C, Rizza V, et al: Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1890-1896.
9. Baylis, P. H. Osmoregulation and control of vasopressin secretion in healthy humans. *Am. J. Physiol.* 1987;253, R671–R678

10. Bolignano D, Basile G, Parisi P, et al: Increased plasma neutrophil gelatinase–associated lipocalin levels predict mortality in elderly patients with chronic heart failure. *Rejuvenation Res* 2009;12:7-14
11. Bowman, R. H. Renal secretion of [35-S] furosemide and depression by albumin binding. *Am. J. Physiol.* 1975; 229, 93–98.
12. Brater, D. C. Diuretic therapy. *N. Engl. J. Med.* 1998;339, 387–395
13. Brown N, Segev G, Francey T, Kass P, Cowgill LD. Glomerular filtration rate, urine production and fractional clearance of electrolytes in acute kidney injury in dogs and their association with survival. *J Vet Intern Med.* 2015; 29:28–34.
14. Cadnapaphornchai, M. A., Gurevich, A. K., Weinberger, H. D. & Schrier, R. W. Pathophysiology of sodium and water retention in heart failure. *Cardiology.* 2001; 96, 122–131
15. Charloux, A., Piquard, F., Doutreleau, S., Brandenberger, G. & Geny, B. Mechanisms of renal hyporesponsiveness to ANP in heart failure. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003; 33, 769–778
16. Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, Goldstein SL, Siew ED, Bagshaw SM et al Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the acute disease quality initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat Rev Nephrol.* 2017; 13(4):241–257.
17. Cobrin AR, Blois SL, Kruth SA, Abrams-Ogg ACG, Dewey C. Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *Journal of Small Animal Practice,* 2013;54:647–655.
18. Cowgill LD, Langston C. Acute kidney insufficiency. In: *Nephrology and Urology of Small Animals* (John Wiley & Sons, Ltd) 2011. p. 472– 523. doi: 10.1002/9781118785546.ch49
19. Damman, K. et al. Congestion in chronic systolic heart failure is related to renal dysfunction and increased mortality. *Eur. J. Heart Fail.* (2010), 12, 974–982.

20. Damman, K. et al. Decreased cardiac output, venous congestion and the association with renal impairment in patients with cardiac dysfunction. *Eur. J. Heart Fail.* 2007. 9, 872–878
21. Damman, K., Voors, A. A., Navis, G., van Veldhuisen, D. J. & Hillege, H. L. The cardiorenal syndrome in heart failure. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2011; 54, 144–153.
22. Damman K, van Veldhuisen DJ, Navis G, et al: Tubular damage in chronic systolic heart failure is associated with reduced survival independent of glomerular filtration rate. *Heart* 2010;96:1297-1302.
23. Damman K, van Veldhuisen DJ, Navis G, et al: Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), a marker of tubular damage, is increased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2008 ;10:997-1000
24. Damman K, Jaarsma T, Voors AA, et al: Both in- and out-hospital worsening of renal function predict outcome in patients with heart failure: results from the Coordinating Study Evaluating Outcome of Advising and Counseling in Heart Failure (COACH). *Eur J Heart Fail.* 2009;11:847-854.
25. De Loor J, Daminet S, Smets P, Maddens B, Meyer E. Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. *J Vet Intern Med.* 2013;27: 998–1010.
26. Doering A, Jenkins CA, Storrow AB, et al. Markers of diuretic resistance in emergency department patients with acute heart failure. *Int J Emerg Med.* 2017;10(1):17.
27. Disease K (2012) Improving global outcomes (KDIGO) acute kidney injury work group 2012 KDIGO clinical practice guidelines AKI: AKI definition. *Kidney Int Supplements* 2(1):19–36.
28. Doering A, Jenkins CA, Storrow AB, et al. Markers of diuretic resistance in emergency department patients with acute heart failure. *Int J Emerg Med.* 2017;10(1):17.
29. Ellison, D. H. Diuretic therapy and resistance in congestive heart failure. *Cardiology* (2001);96, 132–143

30. Eijkelkamp WB, Zhang Z, Remuzzi G, et al: Albuminuria is a target for renoprotective therapy independent from blood pressure in patients with type 2 diabetic nephropathy: post hoc analysis from the Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan (RENAAL) trial. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1540-1546
31. Gullapalli N, Bloch MJ, Basile J. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade in high-risk hypertensive patients: current approaches and future trends. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2010; 4(6) 359-373
32. Guyton, A. & Hall, J. in *Medical Physiology* (Elsevier Saunders, 2006).
33. Harris, P. J., Thomas, D. & Morgan, T. O. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature.* 1987; 326, 697–698
34. Huang C, Kuo E. Mechanism of hypokalemia in magnesium deficiency. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(10):2649–2652.
35. Hesse, B., Parving, H. H., Lund-Jacobsen, H. & Noer, I. Transcapillary escape rate of albumin and right atrial pressure in chronic congestive heart failure before and after treatment. *Circ. Res.* 1976; 39, 358–362.
36. Hillege, H. L. et al. Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000;102, 203–210
37. Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, et al: Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation* 2002;106:1777-1782.
38. Himmelfarb J, Joannidis M, Molitoris B, et al. Evaluation and initial management of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3: 962–967.
39. Hori Y, Takusagawa F, Ikadai H, Uechi M, Hoshi F, Higuchi S. Effects of oral administration of furosemide and torsemide in healthy dogs. *Vet Res.* 2007;68(10):1058-1063.

40. Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, Zarbock A, Palevsky PM, Bagshaw SM et al (2018) Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 14(10):607–625.
41. Unger, T. & Li, J. The role of the reninangiotensin-aldosterone system in heart failure. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004. (Suppl. 1), S7–S10
42. Legatti SAM, El Dib R, Legatti E, Botan AG, Camargo SEA, Agarwal A, et al. Acute kidney injury in cats and dogs: a proportional meta-analysis of case series studies. *PLoS ONE.* (2018) 13: e0190772. doi: 10.1371/journal.pone.0190772
43. Levine, T. B., Francis, G. S., Goldsmith, S. R., Simon, A. B. & Cohn, J. N. Activity of the sympathetic nervous system and reninangiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* (1982) 49, 1659–1666
44. Liang, F. et al. Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 49, 1071–1078
45. Loon, N. R., Wilcox, C. S. & Unwin, R. J. Mechanism of impaired natriuretic response to furosemide during prolonged therapy. *Kidney Int.* (1989);36, 682–689
46. Gabrielsen A, Bie P, Holstein-Rathlou NH, Christensen NJ, Warberg J, DigePetersen H, et al. Neuroendocrine and renal effects of intravascular volume expansion in compensated heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281(2):R459–6.
47. Imanishi M, Yoshioka K, Konishi Y, et al: Glomerular hypertension as one cause of albuminuria in type II diabetic patients. *Diabetologia.* 1999;42:999-1005.
48. James MT, Bhatt M, Pannu N, Tonelli M. Long-term outcomes of acute kidney injury and strategies for improved care. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(4):193–205
49. Jackson CE, Solomon SD, Gerstein HC, et al: Albuminuria in chronic heart failure: prevalence and prognostic importance. *Lancet.* 2009; 374, 543–550

50. Kaissling, B., Bachmann, S. & Kriz, W. Structural adaptation of the distal convoluted tubule to prolonged furosemide treatment. *Am. J. Physiol.* 1985; 248, F374–F381
51. Kazory A. Emergence of blood urea nitrogen as a biomarker of neurohormonal activation in heart failure. *Am J Cardiol.* 2010 Sep 1;106(5):694-700. doi: 10.1016/j.amjcard.2010.04.024. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20723648.
52. Kellum JA, Prowle JR Paradigms of acute kidney injury in the intensive care setting. *Nat Rev Nephrol.* 2018; 14(4):217–230.
53. Kellum JA, Sileanu FE, Murugan R, Lucko N, Shaw AD, Clermont G Classifying AKI by urine output versus serum creatinine level. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26(9):2231–2238
54. Kramer AB, van Timmeren MM, Schuur TA, et al: Reduction of proteinuria in adriamycin-induced nephropathy is associated with reduction of renal kidney injury molecule (Kim-1) over time. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F1136-F1145.
55. Krick, W., Wolff, N. A. & Burckhardt, G. Voltage-driven p-aminohippurate, chloride, and urate transport in porcine renal brushborder membrane vesicles. *Pflugers Arch.* 441, 125–132 (2000).
56. Kumar D, Bagarhatta R. Fractional excretion of sodium and its association with prognosis of decompensated heart failure patients. *J Clin Diagnostic Res.* 2015;9(4):OC01-OC03.
57. Magaldi AJ, Yasuda PN, Kudo LH, Seguro AC, Rocha AS. Renal involvement in leptospirosis: a pathophysiologic study. *Nephron.* 1992;62(3):332-9. doi: 10.1159/000187069. PMID: 1436348.
58. Makris K, Spanou L. Acute kidney injury: diagnostic approaches and controversies. *Clin Biochem Rev.* 2016; 37:153–175.
59. Masson S, Latini R, Milani V, et al: Prevalence and prognostic value of elevated urinary albumin excretion in patients with chronic heart failure: data from the GISSI-Heart Failure trial. *Circ Heart Fail.* 2010; 3:65-72

60. Mullens, W. et al. Importance of venous congestion for worsening of renal function in advanced decompensated heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;53, 589–596
61. Oyama MA, Peddle GD, Reynolds CA, Singletary GE. Use of the loop diuretic torsemide in three dogs with advanced heart failure. *J Vet Cardiol.* 2011;13(4):287-292.
62. Pichette, V., Geadah, D. & du Souich, P. The influence of moderate hypoalbuminaemia on the renal metabolism and dynamics of furosemide in the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* (1996);119, 885–890
63. Priyanka P, Zarbock A, Izawa J, Gleason TG, Renfurm RW, Kellum JA The impact of acute kidney injury by serum creatinine or urine output criteria on major adverse kidney events in cardiac surgery patients. (2020) *J Thorac Cardiovasc Surg.*
64. Pollock CA, Poronnik P: Albumin transport and processing by the proximal tubule: physiology and pathophysiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16:359-364.
65. Prowle J, Bagshaw SM, Bellomo R. Renal blood flow, fractional excretion of sodium and acute kidney injury: time for a new paradigm? *Curr Opin Crit Care.* 2012; 18:585–592.
66. Ronco C, Bellomo R, Kellum J (2017) Understanding renal functional reserve. *Intensive Care Med* 43(6):917–920.
67. Schetz M, Schortgen F (2017) Ten shortcomings of the current definition of AKI. *Intensive Care Med* 43(6):911–91.
68. Schrier, R. W. & Abraham, W. T. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 1999;341, 577–585
69. Schrier, R. W. Blood urea nitrogen and serum creatinine: not married in heart failure. *Circ. Heart Fail.* 2008;1, 2–5
70. Schrier, R. W., Berl, T. & Anderson, R. J. Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. *Am. J. Physiol.* 1979; 236, F321–F332.

71. Segev G, Daminet S, Meyer E, et al. Characterization of kidney damage using several renal biomarkers in dogs with naturally occurring heatstroke. *Vet J.* 2015; 206:231–235.
72. Seguro AC, Lomar AV, Rocha AS. Acute renal failure of leptospirosis: non-oliguric and hypokalemic forms. *Nephron* 1990; 55(2):146–151
73. Seguro AC, Andrade L. Pathophysiology of leptospirosis. *Shock* 2013; 39(Suppl 1):17–23.
74. Singh D, Shrestha K, Testani JM, et al. Insufficient natriuretic response to continuous intravenous furosemide is associated with poor long-term outcomes in acute decompensated heart failure. *J Card Fail.* 2014;20(0 1):392-399
75. Singh A, Friden V, Dasgupta I, et al: High glucose causes dysfunction of the human glomerular endothelial glycocalyx. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:F40-F48.
76. Smilde TD, Damman K, van der Harst P, et al: Differential associations between renal function and “modifiable” risk factors in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol* 2009;98:121-129.
77. Stehouwer CD, Henry RM, Dekker JM, et al: Microalbuminuria is associated with impaired brachial artery, flow-mediated vasodilation in elderly individuals without and with diabetes: further evidence for a link between microalbuminuria and endothelial dysfunction—the Hoorn Study. *Kidney Int Suppl* 2004:S42-S44.
78. Tangeman LE, Littman MP. Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 cases (2000-2010). *J Am Vet Med Assoc* 2013; 243(9):1316–1322
79. Ter Maaten JM, Valente M a E, Damman K, Hillege HL, Navis G, Voors A a. Diuretic response in acute heart failure-pathophysiology, evaluation, and therapy. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(3):184-192.
80. Ter Maaten JM, Valente MAE, Metra M, et al. A combined clinical and biomarker approach to predict diuretic response in acute heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2016;105(2):145-153.

81. Testani JM, Brisco MA, Turner JM, et al. Loop diuretic efficiency: a metric of diuretic responsiveness with prognostic importance in acute decompensated heart failure. *Circ Hear Fail.* 2015;27(4):215-225.
82. Thoen ME, Kerl ME et al: Characterization of acute kidney injury in hospitalized dogs and evaluation of a veterinary acute kidney injury staging system. *J Vet Emerg Crit Care* 21(6) 2011; 648-657.
83. Troia R, Guarin M, Grisetti C, Serafini F, Magna M, Monari E, et al: Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: Diagnostic and prognostic implications. *J Vet Intern Med.* 2018;1–11.
84. Uchino S, Bellomo R, Bagshaw SA, Goldsmith D. Transient azotemia is associated with a high risk of death in hospitalized patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25:1833–1839.
85. Unwin RJ, Luft FC, Shirely DG. Pathophysiology and management of hypokalemia: a clinical perspective. *Nat Rev Nephrol* 2011;7(2):75–84.
86. Uwai, Y., Saito, H., Hashimoto, Y. & Inui, K. I. Interaction and transport of thiazide diuretics, loop diuretics, and acetazolamide via rat renal organic anion transporter rOAT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2000); 295, 261–265.
87. Vallon, V., Miracle, C. & Thomson, S. Adenosine and kidney function: potential implications in patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2008;10, 176–187
88. van Timmeren MM, Vaidya VS, van Ree RM, et al: High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of graft loss in renal transplant recipients. *Transplantation* 2007;84: 1625-1630.
89. Vanmassenhove J, Glorieux G, Hoste E, Dhondt A, Vanholder R, Van Biesen W. Urinary output and fractional excretion of sodium and urea as indicators of transient versus intrinsic acute kidney injury during early sepsis. *Crit Care.* 2013;17: R234.

90. Voors AA, Davison BA, Teerlink JR, Felker GM, Cotter G, Filippatos G, et al. Diuretic response in patients with acute decompensated heart failure: characteristics and clinical outcome—an analysis from RELAX-AHF. *Eur J Heart Fail.* 2014;16(11):1230–40. Epub 2014/10/08.
91. Waanders F, Vaidya VS, van GH, et al: Effect of renin-angiotensinaldosterone system inhibition, dietary sodium restriction, and/or diuretics on urinary kidney injury molecule 1 excretion in nondiabetic proteinuric kidney disease: a post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* 2009;53:16-25.
92. van de Wal RM, Asselbergs FW, Plokker HW, et al: High prevalence of microalbuminuria in chronic heart failure patients. *J Card Fail* 2005;11:602-606.
93. Wen-Hui, Dao-Hong L, Hyacinth S: Regulation of ROMK Channels by Protein Tyrosine Kinase and Tyrosine Phosphatase. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 2002. Vol 12, Issue 3, Pages 138-142
94. Weber, K. T: Aldosterone in congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345, 1689–1697
95. Wegria R, Capeci NE, Blumenthal MR, et al: The pathogenesis of proteinuria in the acutely congested kidney. *J Clin Invest* 1955;34: 737-743
96. Wilcox, C. S. et al. Response of the kidney to furosemide. I. Effects of salt intake and renal compensation. *J. Lab. Clin. Med.* 1983;102, 450–458