

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

**Dottorato di Ricerca in
SCIENZE VETERINARIE
XXVII ciclo**

Settore concorsuale di afferenza

**07/H4 - Clinica Medica e
Farmacologia Veterinaria**

Settore scientifico-disciplinare

**VET/08 Clinica Medica
Veterinaria**

Titolo della Tesi:

**FATTORI PROGNOSTICI IN CORSO DI
MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)
NEL CANE**

Presentata da

Dr Marta GRUARIN

Relatore

Dr Francesco DONDI

Coordinatore

Prof. Carlo TAMANINI

Esame finale anno 2015

INDICE

INTRODUZIONE	5
---------------------	----------

PARTE GENERALE

CAPITOLO 1

MALATTIA RENALE CRONICA	7
1.1 Definizione	7
1.2 Eziologia e patogenesi	9
1.3 Manifestazioni cliniche	13
1.4 Reperti clinicopatologici	17
1.5 Stadiazione IRIS	21
1.6 Prognosi	23

CAPITOLO 2

FATTORI DI RISCHIO PER LO SVILUPPO DI CKD IN MEDICINA UMANA	24
2.1 Fattori non modificabili	25
2.2 Fattori modificabili	29

CAPITOLO 3

FATTORI DI RISCHIO PER LO SVILUPPO DI CKD IN MEDICINA VETERINARIA	38
3.1 Fattori di suscettibilità	38
3.2 Fattori scatenanti	40
3.3 Fattori di peggioramento	42

CAPITOLO 4

TERAPIA DELLA CKD IN MEDICINA VETERINARIA	47
4.1 Terapia dietetica	47
4.2 Gestione della sintomatologia gastroenterica	48
4.3 Terapia dell'iperfosfatemia	48

4.4 Terapia con calcitriolo	49
4.5 Terapia dell'acidosi metabolica	49
4.6 Idratazione	50
4.7 Terapia della proteinuria	50
4.8 Terapia dell'ipertensione arteriosa	52
4.9 Terapia dell'anemia	53
4.10 Follow-up e monitoraggio	54

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 5

OBIETTIVI	56
------------------	-----------

CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI	57
6.1 Selezione dei pazienti nefropatici cronici	57
6.2 Stadiazione IRIS, altre categorie diagnostiche ed exitus	58
6.3 Metodiche di prelievo e processazione dei campioni	58
6.4 Metodiche analitiche	60
6.5 Misurazione della pressione arteriosa	64
6.6 Diagnostica per immagini	65
6.7 Analisi statistica	65

CAPITOLO 7

RISULTATI	67
7.1 Popolazione selezionata e dati epidemiologici	67
7.2 Risultati delle indagini clinicopatologiche nella popolazione CKD	70
7.3 Risultati delle indagini clinicopatologiche nel gruppo "morti"	74
7.4 Risultati relativi alla valutazione dei segni clinici	77
7.5 Risultati delle indagini di diagnostica per immagini	80

7.6 Fattori prognostici e analisi della sopravvivenza	81
---	----

CAPITOLO 8

DISCUSSIONE	87
--------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	93
---------------------	-----------

Introduzione

Il miglioramento generale della qualità di vita dei piccoli animali occorso negli ultimi 20 anni e legato, ad esempio, a migliori standard alimentari, diverso stile di vita ed aumento delle attenzioni dedicate da parte dei proprietari, ha reso possibile anche un aumento dell'aspettativa di vita degli stessi; contemporaneamente, però, ha portato alla luce, o ha fatto aumentare in termini di frequenza, una serie di patologie "tipiche" dell'età medio-avanzata. Tra queste, le patologie renali croniche (e più in generale quelle nefro-urologiche) si sono diffuse in modo sensibile, richiedendo parallelamente una maggiore attenzione da parte del medico veterinario.

Molte delle conoscenze veterinarie in ambito di malattia renale cronica derivano da studi clinici e sperimentali che hanno una forte controparte in medicina umana, ambito in cui le conoscenze mediche nefrologiche sono sicuramente più approfondite. In medicina umana i fattori prognostici sono ben noti e, seppur soggetti a continue revisioni, sono utilizzati quotidianamente nei pazienti ospedalizzati e non, e sono diventati il target di terapie mediche mirate. In medicina veterinaria, invece, le conoscenze in merito ai fattori prognostici sono scarse e solo alcuni di quelli riconosciuti in medicina umana hanno trovato conferma totale o parziale.

Recentemente, la ricerca su tali fattori in medicina veterinaria ha avuto un certo incremento, poiché sempre di più il proprietario vuole conoscere quali sono le reali prospettive del suo animale, in particolare se deve affrontare costi elevati come quelli che solitamente sono richiesti per la gestione a lungo termine di un paziente "renale".

La tesi qui presentata affronterà inizialmente lo stato dell'arte in merito alla malattia renale cronica del cane e all'inquadramento diagnostico di tale patologia nella pratica clinica. Saranno, inoltre, rivisti in maniera critica i principali fattori di rischio riportati in medicina umana cercando di confrontarli, successivamente, con quelli attualmente riconosciuti in medicina veterinaria.

In una seconda parte della tesi saranno esposti i risultati del lavoro sperimentale mirato al riconoscimento ed alla quantificazione di potenziali nuovi fattori prognostici in corso di malattia renale cronica del cane.

PARTE GENERALE

Capitolo 1

Malattia renale cronica

La malattia renale cronica (*Chronic Kidney Disease*, CKD) è la forma di nefropatia più frequentemente diagnosticata nel cane e nel gatto. Colpisce animali di ogni età, ma interessa in particolare pazienti anziani, con prevalenze del 10% nei cani e del 15% nei gatti al di sopra dei 15 anni di età (Polzin, 2011). La CKD è descritta come una malattia irreversibile e progressiva, con un decorso che tipicamente non è rapido, ma prolungato per mesi o addirittura anni (Jacob *et al.*, 2002).

1.1 Definizione

La malattia renale cronica può essere definita come:

- danno renale che perdura per un periodo di almeno 3 mesi, in presenza o meno di riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (*Glomerular Filtration Rate*, GFR);
- calo del GFR di almeno il 50% rispetto ai valori normali, che perdura per almeno 3 mesi.

L'intervallo di tempo di 3 mesi è un riferimento fondamentale nella diagnosi di CKD in quanto, successivamente ad un danno renale, si può assistere a fenomeni di ipertrofia renale compensatoria e miglioramento della funzionalità renale che possono durare anche alcuni mesi. Il periodo di 3 mesi viene quindi utilizzato come *cut-off* nella distinzione tra malattie renali acute e croniche (Polzin, 2010). Tale dato, tuttavia, è stato traslato dalla medicina umana e potrebbe non essere così appropriato per la medicina veterinaria.

Quando si parla di danno renale si intende una alterazione funzionale e/o strutturale a carico di uno o entrambi i reni. Tale danno può essere riconosciuto tramite la valutazione istopatologica di campioni di biopsia renale, oppure tramite la ricerca di *marker* in campioni ematici o urinari, o sfruttando la diagnostica per immagini (Tabella 1.1). Più raramente può essere individuato attraverso la visita clinica.

La velocità di filtrazione glomerulare (GFR) è considerata il parametro migliore per valutare la funzionalità renale ed è definita come il volume di ultrafiltrato prodotto dalla filtrazione glomerulare per unità di tempo (Lefebvre, 2011). Il GFR può essere valutato attraverso la *clearance* di adeguati *marker*: ad oggi il miglior *marker* indiretto di GFR è la

concentrazione sierica di creatinina, mentre la molecola esogena considerata *gold standard* per la misurazione diretta del GFR è l'inulina. L'inulina è un polimero glucidico, e il protocollo per la misurazione della sua *clearance* prevede la somministrazione endovenosa in infusione continua della molecola ed il cateterismo vescicale per ottenere campioni urinari a diversi intervalli di tempo. Poiché si tratta di una tecnica invasiva e, oltre a questo, la misurazione laboratoristica dell'inulina è complessa, nella routine clinica questo *marker* non viene utilizzato. Per le stesse ragioni, anche altre molecole esogene come lo ioexolo o la $^{53}\text{Cr-EDTA}$, benché efficaci nella valutazione del GFR, sono raramente usate.

Nella pratica clinica della medicina umana il GFR viene stimato in base alla *clearance* di sostanze endogene, nello specifico della creatinina, tramite la raccolta di urine delle 24 ore e un prelievo di sangue: in entrambi i campioni si misura la concentrazione di creatinina e, applicando tale dato all'interno di una equazione nella quale sono considerati anche altri parametri sia demografici che clinici, è possibile ricavare la stima del GFR.

In medicina veterinaria, la stima del GFR si basa invece soltanto sulla misurazione plasmatica della concentrazione di creatinina endogena, a causa della difficoltà nell'eseguire la raccolta delle urine delle 24 ore.

Tabella 1.1: Marker di danno renale.

Marker ematici	<ul style="list-style-type: none"> - elevata concentrazione di urea - elevata concentrazione di creatinina - iperfosfatemia - iperkaliemia o ipokaliemia - acidosi metabolica - ipoalbuminemia
Marker urinari	<ul style="list-style-type: none"> - incapacità di concentrare le urine - proteinuria - cilindruria - ematuria di origine renale - pH urinario inadeguato - inadeguata presenza di glucosio - cistinuria
Diagnostica per immagini, alterazioni in:	<ul style="list-style-type: none"> - dimensioni - forma - localizzazione - densità - numero - mineralizzazione

Modificato da Polzin, 2010

1.2 Eziologia e patogenesi

La malattia renale cronica può essere causata da numerose e differenti patologie familiari, congenite, o acquisite (Tabella 1.2). La possibilità di individuare precocemente le cause scatenanti di CKD sarebbe di grande importanza nel trattamento della malattia, tuttavia, questa evenienza si verifica piuttosto raramente, ed è frequente che la causa non venga mai riconosciuta poiché la diagnosi clinica di CKD è solitamente una diagnosi tardiva. La difficoltà nell'individuare l'eziologia della CKD, infatti, risiede anche nel carattere di progressività della malattia stessa. Polzin ha descritto tre fenomeni che caratterizzano l'evoluzione della CKD: le componenti dei nefroni, ovvero glomeruli, capillari peritubulari, tubuli e tessuto interstiziale, sono interdipendenti da un punto di vista funzionale; le risposte funzionali e morfologiche da parte del tessuto renale nei confronti di insulti di varia natura sono molto limitate e spesso comuni a differenti agenti eziologici; infine, la maturazione dei nefroni si completa a circa un mese di età, e dopo questo momento l'organismo non è più in grado di formarne di nuovi per sostituire quelli irreversibilmente danneggiati (Polzin, 2011). Risulta chiaro, quindi, che la possibilità di riconoscere l'eziologia e la localizzazione delle lesioni primarie si verifica soltanto nelle fasi iniziali della CKD.

Tabella 1.2: Principali cause di malattia renale cronica.

Familiari e congenite	Acquisite
Amiloidosi	Infettive: batteriche, micotiche, parassitarie
Displasia	(Leishmaniosi), virali (FIP, FeLV)
Sindrome di Fanconi	Ipercalcemia
Glomerulopatie	Neoplastiche: linfosarcoma, carcinoma renale,
Malattia policistica	neuroblastoma
	Idronefrosi bilaterale
	Nefrolitiasi
	Sequela di danno renale acuto
	Sostanze nefrotossiche
	Amiloidosi
	Glomerulopatie immunomediate
	Iperensione sistemica
	Ischemia renale
	Idiopatiche

Modificato da Polzin, 2010

Nonostante le difficoltà illustrate in precedenza, è comunque rilevante cercare di individuare la causa sottostante la CKD per determinare se essa sia ancora attiva o meno: una specifica terapia diretta ad eliminare o controllare la causa primaria a volte non è in grado di migliorare le esistenti lesioni renali, ma è fondamentale nel tentativo di ridurre la progressione della malattia e il danno diretto ai nefroni.

La funzionalità renale è associata al numero di nefroni funzionanti, e in corso di CKD tale numero diminuisce in maniera progressiva: si ritiene che, inizialmente, la riduzione dei nefroni sia legata al processo primario che causa la CKD. Alcuni studi su modelli animali hanno poi illustrato una teoria di progressione spontanea della nefropatia: la perdita di un quantitativo “critico” di massa renale comporterebbe un graduale declino della funzionalità, che progredisce indipendentemente dalla causa iniziale di danno renale (Hostetter *et al.*, 2011; Rennke *et al.*, 2007). Nel cane, una riduzione sperimentale pari a 15/16 della massa renale totale, comporta lo sviluppo di lesioni quali glomerulosclerosi focale e segmentale, e fibrosi e infiltrato infiammatorio a livello tubulointerstiziale (Finco *et al.*, 1992; Polzin, 2011).

Si ritiene che i nefroni rimasti vitali dopo un insulto, in un tentativo di mantenere un'adeguata funzionalità renale, vadano incontro a un aumentato carico di lavoro. La funzionalità totale renale, infatti, è data dalla somma della funzionalità di ogni singolo nefrone: in questo modo l'organo è in grado di minimizzare la perdita di funzionalità associata ad alterazioni strutturali. Per compensare la perdita dei nefroni ed aumentare quindi il GFR di ogni singolo nefrone, viene indotta una riduzione della resistenza dell'arteriola glomerulare, cui consegue una marcata vasodilatazione dell'arteriola afferente (Figura 1.1). Questo processo comporta ipertensione intraglomerulare, come conseguenza di un'aumentata trasmissibilità della pressione arteriosa sistemica al glomerulo; iperperfusione glomerulare, per aumentato flusso plasmatico; ed infine, iperfiltrazione glomerulare.

Il meccanismo di compensazione descritto risulta però essere, con il tempo, dannoso per il rene stesso. L'ipertrofia e l'ipertensione glomerulare promuovono un insulto a carico delle cellule epiteliali, che è stato associato ad accumulo di sostanza ialina nella parete dei capillari glomerulari e a carico delle cellule endoteliali, con conseguente rischio di trombosi capillare (Rennke *et al.*, 2007). Inoltre, sia l'ipertensione che l'iperperfusione promuovono un aumento del volume e della superficie filtrante a cui però non corrisponde un'adeguata risposta funzionale dei podociti, che vanno incontro a ipertrofia, ma non iperplasia. Quando viene superata la capacità dei podociti di mantenere

l'integrità dei pedicelli e della barriera che essi creano, porzioni focali e segmentali delle cellule epiteliali sottostanti vengono scoperte, permettendo un aumentato flusso di acqua e il passaggio di soluti ed alcune macromolecole (ad esempio, proteine plasmatiche). Inoltre, la mancata integrità dei podociti è associata a proteinuria e glomerulosclerosi.

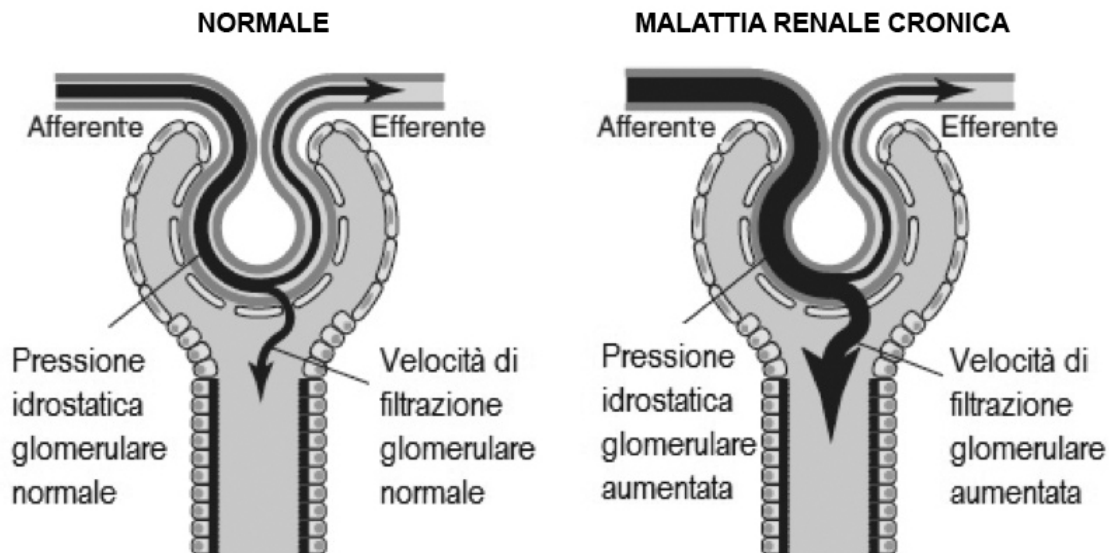


Figura 1.1: Rappresentazione dello sviluppo del “super nefrone” come risultato dell’adattamento alla perdita di massa renale: l’aumento del GFR del singolo nefrone è ottenuto grazie alla vasodilatazione dell’arteriola afferente. *Modificato da Chew et al., 2011.*

La proteinuria di origine glomerulare si osserva a carico dei nefroni i cui podociti sono stati danneggiati e rappresenta l’indicatore più precoce di un danno nell’integrità renale. La proteinuria di origine tubulare, invece, è determinata dal mancato riassorbimento delle proteine a basso peso molecolare che fisiologicamente sono in grado di superare la barriera di filtrazione glomerulare, per poi essere riassorbite dalle cellule epiteliali dei tubuli. Le cause più frequenti di alterazioni in questo meccanismo di riassorbimento sono legate alla diminuzione numerica dei tubuli funzionanti, e all’aumento dell’ultrafiltrato risultante dai processi di iperfiltrazione precedentemente descritti, oltre a tubulopatie come, ad esempio, la sindrome di Fanconi.

La proteinuria è un fattore di rischio indipendente per la progressione della CKD, sia nel cane che nel gatto (Jacob *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2006). I meccanismi che giustificano tale progressione sono molteplici e implicano complesse interazioni tra numerosi processi di danno cellulare. Si ritiene che alcune proteine, come la transferrina o le IgG, possano causare un danno tossico alle cellule epiteliali del tubulo, stimolando anche la produzione di molecole pro-infiammatorie come la MCP-1, una proteina chemoattrattiva dei monociti. Un eccessivo accumulo di proteine nel lume del tubulo contorto prossimale

potrebbe causare un danno poiché le proteine, in seguito all'endocitosi, scatenano una cascata di eventi intracellulari, come la sovraespressione di geni che codificano molecole vasoattive e pro-infiammatorie, e che contribuiscono ad alterare lo spazio tubulointerstiziale. La proteinuria è stata anche indicata come causa primaria della differenziazione delle cellule epiteliali tubulari in miofibroblasti: uno dei mediatori di tale trasformazione è il *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β), che promuove anche la sintesi di matrice extracellulare ed è considerato essere uno dei maggiori promulgatori della fibrosi. Un altro importante meccanismo che lega la proteinuria alla progressione della CKD è la formazione di cilindri proteici nel tubulo renale: a livello tubulare, infatti, avviene il riassorbimento dell'acqua e un'aumentata presenza di proteine potrebbe quindi favorire la formazione di tali cilindri, che a loro volta potrebbero determinare ostruzione intratubulare (Abbate *et al.*, 2006).

In medicina umana, in presenza di patologie glomerulari si osservano di solito anche lesioni tubulointerstiziali di varia gravità; al contrario, le patologie primarie dello spazio tubulointerstiziale sono caratterizzate da un decorso molto più lento e graduale (D'Amico, 1999). Non è ancora stato del tutto chiarito come le malattie glomerulari riescano a indurre un danno a livello tubulointerstiziale, ma, oltre alla proteinuria, sono stati indicati alcuni fattori quali un'ischemia tubulare secondaria a diminuito flusso post-glomerulare, il passaggio nell'ultrafiltrato di mediatori dell'infiammazione, la deposizione intra-renale di fosfato di calcio e processi immunomediati che si estendono direttamente dal glomerulo al comparto interstiziale (Nath, 1998).

In medicina veterinaria, come già illustrato, l'eziologia delle nefropatie è difficilmente individuabile. Grazie a studi sulle biopsie renali però, si può affermare che la CKD nel cane è prevalentemente scatenata da glomerulopatie primarie, mentre nel gatto la malattia sembra originare da patologie tubulointerstiziali (Minkus *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 2013). Questo reperto potrebbe spiegare la natura lenta e progressiva della CKD felina; al contrario, il declino rapido della funzionalità renale che tipicamente si riscontra nel cane potrebbe essere attribuito all'origine primariamente glomerulare della CKD.

In conclusione, la progressione della malattia renale cronica può essere riassunta in 6 passaggi, teorizzati da Harris e Neilson:

- il danno glomerulare persistente induce ipertensione locale, aumento del GFR di ogni nefrone, e proteinuria;

- la proteinuria, associata ad aumentata produzione di angiotensina II, facilita il passaggio di citochine che inducono un accumulo di cellule mononucleate nell'interstizio;
- dopo un'iniziale comparsa di neutrofili nell'interstizio, essi vengono sostituiti da macrofagi e linfociti T che caratterizzano un quadro di nefrite interstiziale;
- l'infiammazione che colpisce l'epitelio tubulare induce uno sfaldamento delle cellule dalla membrana basale e separazione dalle cellule adiacenti, e si assiste inoltre a alla trasformazione delle cellule epiteliali tubulari in fibroblasti;
- i fibroblasti producono una matrice di collagene, causando la distruzione dei capillari (es: *vasa recta*) e dei tubuli rimasti;
- formazione di tessuto di cicatrizzazione a livello tubulointerstiziale ed evoluzione quindi a uno stadio terminale di malattia renale (Harris e Neilson, 2006).

1.3 Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche in corso di CKD sono di solito piuttosto tardive rispetto all'inizio della nefropatia. Tra i primi sintomi riscontrati dal proprietario sono riportati la poliuria e la polidipsia, che insorgono per la mancata capacità del rene di concentrare le urine; tale evenienza si verifica però se il rene ha subito un declino nella sua funzionalità di almeno i 2/3. Altri segni che caratterizzano le fasi iniziali di CKD sono una progressiva perdita di peso, astenia, e calo dell'appetito che può manifestarsi anche con appetito capriccioso. In un recente studio effettuato in Gran Bretagna, i segni clinici più frequenti associati a CKD sono stati vomito (riportato nel 50% dei soggetti), poliuria/polidipsia (44%) e anoressia o diminuzione dell'appetito (39%) (O'Neill *et al.*, 2013).

Un ulteriore riscontro comune in soggetti con CKD è la disidratazione, caratterizzata dalla perdita di elasticità della cute e dalla secchezza delle mucose. Questi segni si possono sviluppare se la poliuria non è adeguatamente compensata con un aumentato apporto di liquidi (polidipsia), o se è peggiorata da un'ulteriore perdita di fluidi (ad esempio tramite il vomito).

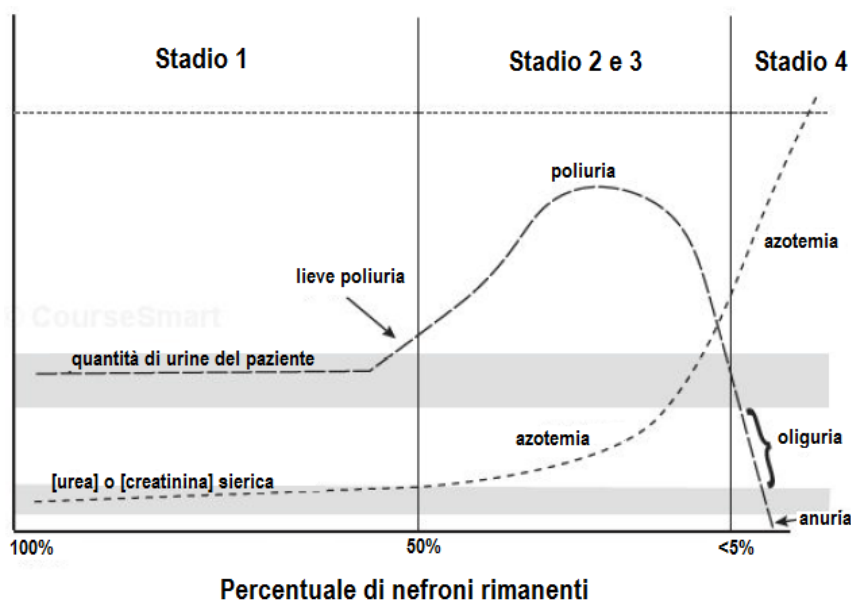


Figura 1.2: Rappresentazione grafica degli effetti secondari alla progressiva perdita di funzionalità renale. *Modificato da Stockham e Scott, 2008.*

Sebbene la diagnosi clinica sia più frequentemente tardiva, esistono alcune particolari situazioni in cui è possibile individuare alcuni segni clinici specifici di una particolare malattia renale, senza che sia già avvenuta un'importante perdita di funzionalità dell'organo.

È il caso della malattia policistica o delle neoplasie renali, che possono essere sospettate tramite palpazione addominale da parte del veterinario; nelle glomerulopatie si può assistere alla comparsa di edemi; nelle nefropatie famigliari o congenite si possono riconoscere dei disturbi nell'accrescimento e poliuria.

Con il termine uremia (o iperazotemia) si individua una condizione multisistemica che è una diretta conseguenza della mancata capacità del rene di svolgere le sue funzioni escretorie ed endocrine: la ritenzione di alcuni metaboliti, definiti appunto come tossine uremiche, insieme ad un'alterazione dell'omeostasi e a variazioni della presenza di alcuni ormoni, contribuiscono allo sviluppo di una sintomatologia che colpisce numerosi organi (Tabella 1.3). Tra le principali tossine uremiche si annoverano l'urea, l'ormone paratiroideo, l'acido urico, la gastrina.

Tabella 1.3: Manifestazioni cliniche comunemente associate ad uremia.

Apparato gastroenterico

Anoressia
Ulcere gastrointestinali
Alitosi
Nausea, vomito
Ulcere orali, stomatite, glossite
Pancreatite

Apparato neuromuscolare

Abbattimento
Affaticabilità
Debolezza muscolare
Tremori muscolari
Polineuropatia periferica
Encefalopatia uremica

Apparato immunitario

Stimolazione infiammatoria
Maggiore sensibilità ad infezioni

Apparato endocrino

Dislipidemia
Resistenza periferica all'insulina
Iperparatiroidismo secondario

Apparato ematopoietico

Coagulopatie
Anemia ipoproliferativa
Linfopenia
Neutrofilia
Disfunzioni piastriniche

Apparato cardiopolmonare

Cardiomiopatia
Ipertensione
Pericardite
Pleurite
Polmonite uremica, edema polmonare

Apparato scheletrico

Amiloidosi
Alterazioni nel metabolismo del calcitriolo
Osteodistrofia
Osteoporosi

Miste

Ipotermia
Aumento della sete
Perdita di peso

Modificato da Ross, 2011

I segni clinici legati ad alterazioni dell'apparato gastroenterico sono i più frequentemente riscontrati nella pratica veterinaria. La mancanza di appetito è stata collegata alla presenza di un fattore anoressizzante nel plasma di roditori uremici (Anderstam *et al.*, 1996) e anche elevate concentrazioni sieriche di leptina sono considerate essere tra i promotori dell'anoressia (Wolf *et al.*, 2002). La comparsa di patologie periodontali è comune nei soggetti con CKD: in uno studio, la presenza di lesioni buccali è stata osservata nel 26% dei gatti in stadio 2 di CKD e nel 44% dei soggetti in stadio 4 (King *et al.*, 2007); in particolare, la stomatite uremica è caratterizzata da lesioni ulcerative orali, necrosi della lingua, e alito urinoso.

Il vomito è un segno clinico piuttosto frequente, e si ritiene sia causato sia dall'azione delle tossine uremiche sui centri del vomito a livello cerebrale, sia dalla gastroenterite uremica. Alcuni studi hanno valutato da un punto di vista istopatologico le lesioni presenti nello stomaco di soggetti iperazotemici: nel cane, la gastropatia uremica è caratterizzata da mineralizzazioni della mucosa, edema, alterazioni vascolari e atrofia delle ghiandole (Peters *et al.*, 2005); nel gatto, sono state osservate soltanto mineralizzazioni e fibrosi, e solamente in soggetti con azotemia moderata/grave (McLeland *et al.*, 2014). Anche la gastrina ha un ruolo importante nello sviluppo della gastropatia poiché l'ipergastrinemia

promuove iperacidità e irritazione gastrica, ed elevati livelli plasmatici di questa molecola sono stati riscontrati in due studi su soggetti con CKD (Goldstein *et al.*, 1998; McLeland *et al.*, 2014).

L'enterocolite uremica, che si manifesta come diarrea spesso emorragica, ha una prevalenza più bassa rispetto alla gastropatia (King *et al.* 2007). È invece più frequente, soprattutto nel gatto, la costipazione secondaria alla disidratazione o alla terapia con chelanti del fosforo.

La progressiva perdita di peso (malnutrizione) cui vanno incontro i pazienti CKD è legata sia ad un inappropriato apporto calorico, sia all'aumento dei processi catabolici che possono essere secondari, ad esempio, all'acidosi metabolica (Chew *et al.*, 2011).

L'encefalopatia uremica e la neuropatia uremica si manifestano quando il GFR scende al di sotto del 10%, con segni come alterazioni della coscienza, convulsioni, letargia, tremori, atassia. La patogenesi di questa sintomatologia non è ancora del tutto chiarita, ma si sospetta che il paratormone svolga un ruolo importante nel regolare la presenza di calcio a livello cerebrale; inoltre, alterazioni degli aminoacidi legate alla malnutrizione o l'accumulo di tossine uremiche potrebbero agire sulla funzionalità dei neurotrasmettitori, e anche l'ipertensione sistemica potrebbe causare alcuni dei segni neurologici (Chew *et al.*, 2011; Polzin, 2010).

In corso di malattia renale cronica l'ipertensione arteriosa si sviluppa per azione di diversi fattori, tra cui la stimolazione del sistema nervoso simpatico, l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone e l'espansione del volume plasmatico per l'alterata escrezione di sodio che si verifica con GFR molto ridotto (Chew *et al.*, 2011). La prevalenza di ipertensione nei pazienti CKD è molto variabile e tale reperto è stato associato a differenze nella malattia renale presente, nella taglia degli animali, nei metodi di misurazione e nelle diverse reazioni all'interazione degli animali con l'uomo, ovvero il cosiddetto "effetto da camice bianco". Gli animali ipertesi corrono un elevato rischio di subire un danno, definito *target-organ damage*, a carico di organi come il rene, l'occhio, il cervello e il sistema cardiovascolare. Nel rene, il *target-organ damage* si manifesta con declino più rapido della funzionalità renale, mortalità e proteinuria (Jacob *et al.*, 2003; Syme *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2007a; Jepson *et al.*, 2007).

L'iperparatiroidismo secondario renale si può sviluppare fin dalle prime fasi della malattia renale cronica, e secondo alcuni studi ha una prevalenza dell'84% nei gatti e del 76% nei cani con CKD (Barber ed Elliott, 1998; Cortadellas *et al.*, 2010). Può essere presente anche in animali che hanno concentrazioni sieriche di calcio e fosforo nella norma

(Nagode *et al.*, 1996). L'origine di questa condizione è multifattoriale e coinvolge numerose molecole, tra cui, principalmente, il fosforo, il paratormone (PTH), il calcitriolo e il *fibroblast growth factor-23* (FGF-23).

Con il declino del GFR si assiste a una diminuita escrezione renale di fosforo, che nelle fasi iniziali di CKD può essere corretta dall'azione del FGF-23, un ormone fosfaturico che agisce però anche sull'attività dell' $1-\alpha$ idrossilasi, contribuendo alla diminuzione del calcitriolo (Gutierrez *et al.*, 2005). Il calcitriolo, e nello specifico una sua diminuita disponibilità, ha un ruolo centrale nello sviluppo di iperparatiroidismo secondario renale e viene formato grazie alla $1-\alpha$ idrossilazione del 25-idrocoleciferolo nelle cellule dei tubuli renali. Il PTH promuove l'attività dell' $1-\alpha$ idrossilasi e la formazione del calcitriolo, mentre il calcitriolo regola la sintesi del PTH tramite un meccanismo di feedback negativo. Inizialmente quindi, i bassi livelli di calcitriolo permettono un'elevata sintesi di PTH; il conseguente iperparatiroidismo però stimola l'attività dell' $1-\alpha$ idrossilasi e quindi la produzione di calcitriolo, consentendo quindi un ritorno ai normali livelli di calcio e fosforo. Il meccanismo descritto viene anche definito come "ipotesi del *trade-off*": i livelli fisiologici di calcitriolo sono mantenuti solo a costo di elevate concentrazioni di PTH con conseguenti effetti deleteri mediati dall'ormone paratiroideo.

Con il peggioramento della CKD e la conseguente diminuzione di cellule tubulari, la produzione di calcitriolo risulta fortemente ridotta. Il deficit di calcitriolo innesca dei meccanismi di resistenza all'azione del PTH a livello scheletrico e, inoltre, comporta un innalzamento del livello plasmatico di calcio a cui avviene la soppressione della secrezione di PTH: ne consegue persistenza di iperparatiroidismo anche con livelli di calcio normali o, addirittura, elevati (Nagode *et al.*, 1996).

Le elevate concentrazioni di PTH possono agire su organi e tessuti quali lo scheletro, il rene, il cervello, il cuore, la muscolatura liscia, i polmoni, gli eritrociti e i linfociti. L'osteodistrofia renale è un reperto clinico poco comune, che interessa soprattutto gli animali giovani colpendo in particolare la mandibola e le ossa della testa con demineralizzazione e fibrosi. L'azione dell'iperparatiroidismo a carico degli altri organi comporta invece letargia, debolezza, anoressia e un aumento dell'incidenza di infezioni secondaria ad immunodeficienza, oltre che, a livello renale, nefrocalcinosi e progressiva perdita di funzionalità renale (Nagode *et al.*, 1996).

1.4 Reperti clinicopatologici

Le alterazioni dei parametri di laboratorio sono piuttosto variabili, e la valutazione di tali reperti è di grande importanza per la diagnosi di CKD e la completezza del quadro diagnostico.

Tabella 1.4: Principali reperti laboratoristici in corso di CKD.

<u>Alterazioni emato-chimiche</u>	<u>Alterazioni urinarie</u>
Iperazotemia	Peso specifico inadeguato
Iperfosfatemia	Proteinuria
Ipokaliemia e iperkaliemia	
Ipercalcemia e ipocalcemia	
Anemia normocitica, normocromica, ipoproliferativa	
Acidosi metabolica	
Ipoalbuminemia	

Modificato da Polzin, 2011

L'**iperazotemia** è definita come un eccesso di urea, creatinina e altri composti azotati non proteici nel sangue; tali molecole vengono eliminate prevalentemente attraverso il rene, e con il declino della funzionalità renale si accumulano nell'organismo (Polzin, 2011). I due parametri più comunemente valutati sono le concentrazioni sieriche di urea e di creatinina, che, solitamente, in corso di CKD aumentano simultaneamente. Tuttavia la concentrazione di urea può essere influenzata da numerosi fattori extrarenali, come emorragie gastrointestinali, aumentato catabolismo proteico, alcuni farmaci come i glucocorticoidi, e sarebbe quindi preferibile utilizzare la creatinina come *marker* di funzionalità renale.

La creatinina, come già illustrato, è ad oggi il più utilizzato indicatore indiretto di funzionalità renale, ma presenta alcune limitazioni che devono essere tenute in considerazione. Essa deriva dalla degradazione della creatina a livello muscolare, pertanto la sua misurazione può risultare alterata in animali con importanti masse muscolari o in soggetti che hanno appena compiuto un notevole sforzo fisico. L'aumento della creatinina oltre gli intervalli fisiologici si verifica poi in soggetti che hanno subito una riduzione del GFR di almeno il 75% e quindi una consistente perdita di nefroni (Figura 1.2): per questo motivo non si può considerare come un *marker* precoce nella diagnosi di CKD, e rimane comunque un parametro poco sensibile.

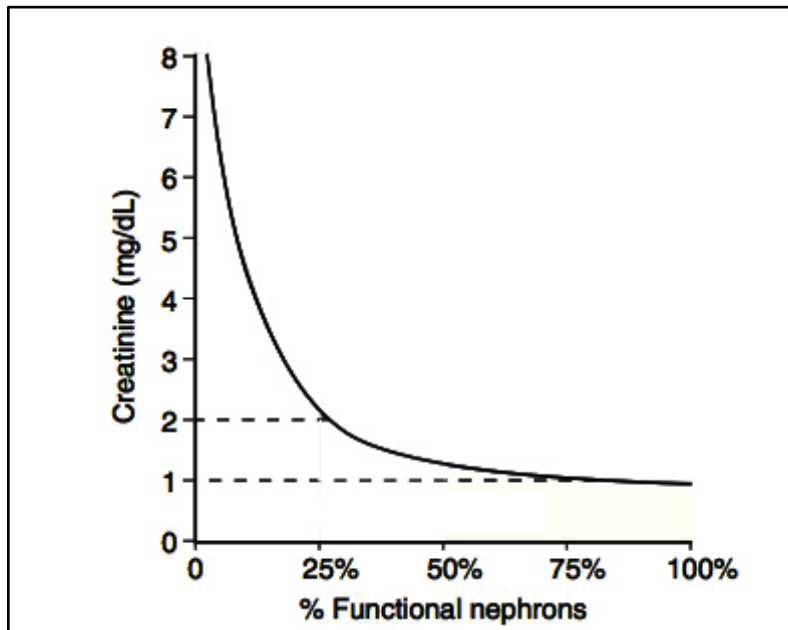


Figura 1.3: La curva rappresenta la relazione tra l'aumento della creatinina e la percentuale dei nefroni funzionanti. *Modificato da Chew et al., 2011.*

Nel valutare la creatininemia bisogna anche tenere conto che essa può essere influenzata da fattori prerenali o postrenali. Per tale motivo, il riscontro dell'alterazione di questo parametro deve sempre essere associato alla valutazione della sintomatologia clinica e del peso specifico urinario; è consigliabile inoltre eseguire delle misurazioni seriali che possono aumentare la sensibilità di questo reperto.

L'eliminazione del **fosforo**, come già illustrato, avviene per via renale. Nelle prime fasi di CKD i livelli del fosforo rimangono nella norma grazie ai meccanismi di compensazione messi in atto dall'organismo. Quando il GFR scende sotto al 20%, però, si sviluppa iperfosfatemia. Le conseguenze di questa alterazione saranno trattate successivamente. I livelli sierici di **potassio** sono, nella maggior parte dei soggetti CKD, nella norma. L'iperkaliemia si sviluppa in pazienti oligurici o anurici ed è un reperto poco frequente. L'ipokaliemia invece è stata riscontrata con una prevalenza che arriva fino al 30% nei gatti, mentre nei cani solitamente non è rilevata; alcune cause di ipokaliemia sono l'anoressia, la persistente disidratazione, il vomito e la poliuria. Le manifestazioni neuromuscolari di questa alterazione elettrolitica rimangono rare, anche se la miopatia ipokaliemica, con il caratteristico reperto di debolezza muscolare soprattutto a carico dei muscoli del collo, è riscontrata frequentemente in gatti con potassio $<2,5$ mEq/L (Chew *et al.*, 2011; Polzin, 2010).

La concentrazione del **calcio** in corso di CKD può essere sia normale, nella maggioranza dei pazienti, che elevata, o diminuita. In uno studio eseguito su gatti con

malattia renale cronica è stata riscontrata ipercalcemia nel 6% dei soggetti e ipocalcemia nel 26% (Barber ed Elliott, 1998). Poiché il calcio totale può essere fortemente influenzato dalla frazione di calcio complessato, è raccomandabile la misurazione del calcio ionizzato, che è stata dimostrata essere il migliore metodo per la valutazione della calcemia in corso di CKD (Chew *et al.*, 2011).

L'**anemia** (normocitica, normocromica e scarsamente rigenerativa) è un reperto piuttosto comune negli animali affetti da CKD e tendenzialmente la sua gravità è proporzionale alla gravità della nefropatia. La valutazione del midollo osseo mostra di solito ipoplasia della linea eritroide, e leucopoiesi e megacariocitopoiesi nella norma. La causa principale di anemia in corso di CKD è la carenza relativa di eritropoietina (EPO), un ormone prodotto per il 90% dalle cellule dell'interstizio peritubulare renale che stimola la produzione di globuli rossi nel midollo osseo. Il deficit di tale ormone è legato alla diminuzione, causata dalla nefropatia, delle cellule a livello renale in grado di produrlo. L'anemia si può anche sviluppare per azione di alcune tossine uremiche sullo stesso midollo osseo e sui globuli rossi, con conseguente riduzione della vita media di queste cellule; per carenza di ferro; per emorragie gastroenteriche croniche, spesso insidiose da diagnosticare perché non accompagnate dai classici reperti clinici quali melena o ematochezia (Chew *et al.*, 2011; Polzin, 2011).

La **acidosi metabolica** è un reperto comune in soggetti con CKD in stadio avanzato, mentre è meno frequente in animali in stadio IRIS 2 e 3 (Elliott *et al.*, 2003). Nelle prime fasi di malattia renale cronica l'acidosi metabolica è ipercloremica, con *anion gap* nella norma; nella fasi avanzate è invece normocloremica con *anion gap* elevato, per l'accumulo di metaboliti acidi come fosfati o solfati che non vengono più eliminati dal rene (Chew *et al.*, 2011). Il rene elimina gli acidi riassorbendo il bicarbonato ultrafiltrato ed eliminando idrogenioni sottoforma di ioni ammonio, o tamponandoli con acidi titolabili come i fosfati; il modo migliore per aumentare l'escrezione di acidi è aumentare la produzione di ammonio a livello di tubuli renali, metabolizzando la glutamina. In corso di CKD si assiste ad un meccanismo compensativo che permette di aumentare l'escrezione di ioni ammonio per singolo nefrone da 3 a 5 volte, tuttavia, quando il GFR scende tra il 10% e il 20% rispetto al normale, tale meccanismo si rivela inadeguato nel rispondere alle esigenze dell'organismo. Oltre a questo, anche la diminuzione di massa renale che caratterizza la CKD, e conseguentemente la diminuita produzione renale di ioni ammonio, può influire nello sviluppo di acidosi metabolica (Chew *et al.*, 2011; Polzin, 2011). Tra le conseguenze cliniche di questa alterazione dell'equilibrio acido-base si

annoverano anoressia, vomito, astenia, letargia, perdita di peso, e aumento del catabolismo proteico.

Il **peso specifico urinario** in corso di CKD è solitamente inadeguato (<1035 nel cane e <1045 nel gatto), e riflette l'incapacità del rene di concentrare le urine. Il raggiungimento dell'isostenuria, ovvero un peso specifico tra 1007 e 1015, è indice di una perdita di nefroni funzionanti pari ad almeno i due terzi della massa renale. In alcuni soggetti, in particolare nei gatti, è possibile che la concentrazione delle urine risulti adeguata anche nelle prime fasi di CKD, con livelli di creatinina sierica tra 2,0 e 3,0 mg/dl (Chew *et al.*, 2011).

L'incapacità del rene di concentrare le urine ha diverse cause, tra cui l'aumentata diuresi di soluti a carico dei singoli nefroni, l'alterazione dell'architettura midollare, e l'alterata risposta renale all'azione dell'ormone antidiuretico (Polzin, 2010).

La **proteinuria** viene misurata principalmente tramite due test. Il primo, il *dipstick* urinario, è un test colorimetrico semiquantitativo molto utilizzato per lo *screening* e la rilevazione ambulatoriale di proteinuria, e in particolare di albuminuria; tuttavia la sensibilità e specificità non sono ottimali, in quanto il test non è in grado di individuare concentrazioni di albumine al di sotto dei 30 mg/dl e può essere influenzato dal peso specifico urinario o dalla pigmentazione delle urine. Nel caso di rilevamento di proteinuria al *dipstick*, sarebbe corretto eseguire una quantificazione delle proteine tramite UPC (*Urine Protein to Creatinine ratio* o rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria) per accertare la gravità del danno renale e indirizzare il trattamento terapeutico. L'UPC è ritenuto il *gold standard* nella misurazione della proteinuria ed è correlato all'escrezione urinaria di proteine nelle 24 ore (Grauer, 2011).

Valori di UPC > 2,0 sono tendenzialmente indicativi di patologie glomerulari quali l'amiloidosi e la nefropatia membranosa, mentre valori inferiori a 2,0 vengono associati a patologie tubulointerstiziali. Non esiste tuttavia un valore di proteinuria che sia diagnostico per un determinato tipo di nefropatia, e spesso si assiste a proteinurie di tipo misto (glomerulare e tubulare), per cui la diagnosi rimane complessa (Lees *et al.*, 2005; Vaden, 2011).

Recentemente tale postulato è stato messo in discussione dal ritrovamento di proteinuria di grado elevato anche in soggetti con esclusivi segni istopatologici renali di danno tubulare (Schneider *et al.*, 2013).

1.5 Stadiazione IRIS

L'*International Renal Interest Society* (IRIS) è stata fondata nel 1998, con lo scopo di indagare i migliori metodi per diagnosticare precocemente la CKD in cani e gatti, e nuove possibili terapie. L'IRIS ha concepito delle linee guida per la diagnosi e il trattamento della CKD che sono riconosciute dalle Società di Nefrologia e Urologia sia americane che europee, e che si basano sulla valutazione della funzionalità renale, della proteinuria e della pressione arteriosa, in base alle quali si classificano i pazienti in 4 stadi. L'utilità di questa stadiazione risiede soprattutto nella possibilità di emettere una prognosi più precisa nei pazienti nefropatici, e in una migliore gestione della terapia e del paziente.

Il primo *step* per stadiare un soggetto in cui si sospetta CKD è la misurazione della creatinina sierica (Tabella 1.5).

Tabella 1.5: Stadi di malattia renale cronica nel cane e nel gatto.

Stadio	Creatinina sierica (mg/dl)		Commenti
	Cane	Gatto	
A rischio	< 1,4	< 1,6	L'anamnesi è suggestiva di un rischio maggiore in futuro di sviluppare CKD per svariati fattori (esposizione a nefrotossine, razza, età)
1	< 1,4	< 1,6	Nonazotemico. Possono essere presenti altre anomalie (peso specifico urinario inadeguato, palpazione renale anomala, proteinuria di origine renale)
2	1,4 – 2,0	1,6 – 2,8	Lieve azotemia. Segni clinici lievi o assenti.
3	2,1 – 5,0	2,9 – 5,0	Azotemia moderata. Possono essere presenti segni clinici extrarenali.
4	> 5,0	> 5,0	Aumentato rischio di segni clinici sistemici e crisi uremiche.

Modificato da www.iris-kidney.com

Questo parametro, come già illustrato, viene correlato alla funzionalità renale: visiti i suoi limiti, però, è consigliabile eseguire almeno due misurazioni distanziate di qualche settimana, con il paziente a digiuno e in buono stato di idratazione, in modo tale da accertare l'effettiva stabilità della malattia renale cronica; inoltre, è sempre adeguato eseguire una concomitante valutazione del peso specifico urinario e delle condizioni cliniche del soggetto.

La stadiazione IRIS della CKD prevede poi la valutazione della proteinuria e della pressione arteriosa (Tabelle 1.6 e 1.7). La proteinuria viene misurata tramite l'UPC, ma è

necessario prima escludere la presenza di infezioni delle vie urinarie, ematuria, o disprotidemia. Idealmente, il valore di UPC andrebbe valutato in almeno tre campioni raccolti nell'arco di due settimane prima di poter determinare lo stadio; i pazienti con proteinuria *borderline* dovrebbero essere nuovamente valutati dopo due mesi per essere riclassificati. Anche per la pressione arteriosa la classificazione finale si dovrebbe basare su misurazioni multiple eseguite nel corso di qualche settimana. Il rischio di *target-organ damage* è minimo nel sottostadio 0 e massimo nel sottostadio 3 (www.iris-kidney.com; Polzin *et al.*, 2011).

Tabella 1.6: Classificazione della proteinuria secondo l'UPC.

Sottostadio	Valore di UPC	
	Cane	Gatto
Non proteinurico	< 0,2	< 0,2
<i>Borderline</i> proteinurico	0,2 – 0,5	0,2 – 0,4
Proteinurico	> 0,5	> 0,4

Modificato da www.iris-kidney.com

Tabella 1.7: Classificazione IRIS della pressione arteriosa.

Sottostadio	Pressione sistolica (mmHg)	Pressione diastolica (mmHg)
0	< 150	< 95
1	150 - 159	95 - 99
2	160 - 179	100 - 119
3	≥ 180	≥ 120

Modificato da www.iris-kidney.com

1.6 Prognosi

Come riportato in precedenza, la CKD è una malattia progressiva ed irreversibile. A causa di tali caratteristiche, il concetto di prognosi applicato a questa patologia non contempla la possibilità del ritorno di un'adeguata funzionalità renale: la prognosi si riferisce alla probabilità del paziente di raggiungere una qualità di vita soddisfacente grazie alla terapia (Polzin, 2011).

I fattori che devono essere considerati per poter emettere una corretta prognosi includono la causa della nefropatia; la gravità e la durata dei segni clinici e delle complicazioni dell'uremia; la possibilità di miglioramento della funzionalità renale; la gravità della compromissione della funzionalità renale e la velocità di progressione del peggioramento di tale funzione; l'età; la qualità delle cure mediche (Polzin, 2010).

Il tempo di sopravvivenza dei pazienti con CKD può essere molto variabile. In uno studio su 211 gatti con creatinina sierica superiore a 2,3 mg/dl il tempo medio di sopravvivenza è stato di 771 giorni; nei gatti in stadio 4 IRIS invece, la sopravvivenza media è stata di soli 35 giorni. Lo stadio IRIS al momento della diagnosi di CKD si è quindi rivelato essere prognostico del tempo di sopravvivenza (Boyd *et al.*, 2008).

Nel cane, in un recente studio, è stato evidenziato che l'aumentare dello stadio IRIS e delle concentrazioni sieriche di azoto ureico sono associati ad una diminuzione del tempo di sopravvivenza (O'Neill *et al.*, 2013).

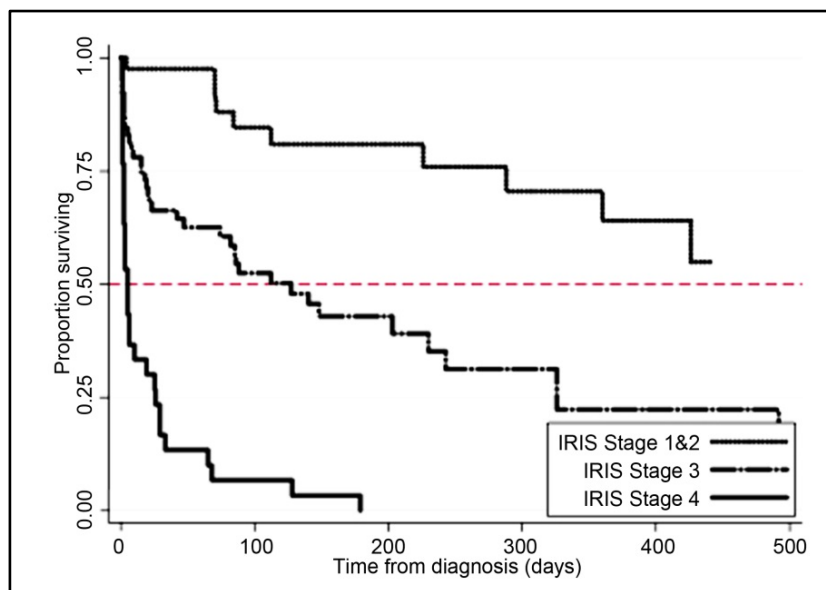


Figura 1.4: Curva di sopravvivenza in cani suddivisi in base alla classificazione in stadi IRIS al momento della diagnosi. Allo stadio IRIS più elevato è associata una diminuita sopravvivenza.

Modificato da O'Neill et al., 2013.

Capitolo 2

Fattori di rischio per lo sviluppo di CKD in medicina umana

In medicina umana, i fattori di rischio per la CKD vengono classificati come:

- fattori di suscettibilità, che predispongono alla CKD;
- fattori scatenanti, che causano direttamente il danno renale;
- fattori di peggioramento, associati ad una già esistente condizione di malattia renale cronica.

Possono essere ulteriormente classificati come:

- modificabili;
- non modificabili (Bello *et al.*, 2010).

Di seguito sono descritti i più rilevanti.

Tabella 2.1: Fattori di rischio associati ad inizio e peggioramento della CKD.

Fattori scatenanti	Fattori di peggioramento
Iperensione sistemica	Età avanzata
Diabete mellito	Genere (maschile)
Malattie cardiovascolari	Razza/etnia
Dislipidemia	Predisposizione genetica
Obesità/sindrome metabolica	Scarso controllo della pressione sanguigna
Iperuricemia	Scarso controllo della glicemia
Fumo	Proteinuria
Basso stato sociale ed economico	Malattie cardiovascolari
Esposizione a nefrotossine: farmaci anti-infiammatori non steroidei, analgescici, esposizione a metalli pesanti come il piombo	Dislipidemia Fumo Obesità/sindrome metabolica Iperuricemia Consumo di alcool Nefrotossine: farmaci anti-infiammatori non steroidi, materiale di contrasto radiografico Danno renale acuto

Modificato da Bello et al., 2010

2.1 Fattori non modificabili

Età

L'età avanzata è associata ad un progressivo declino della funzionalità renale (Shlipak *et al.*, 2009a) (Figura 2.1) e sono numerosi gli studi che concordano con tale affermazione.

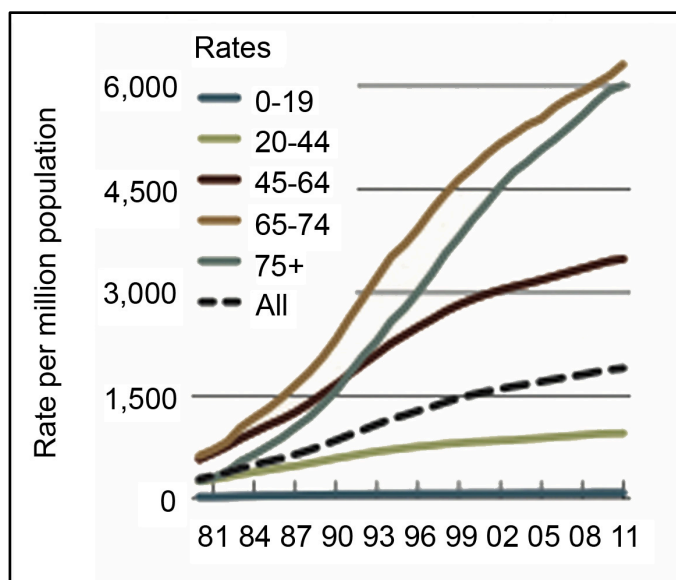


Figura 2.1: Rappresentazione grafica della prevalenza di ERSD in base all'età negli Stati Uniti. Modificato da USRDS, 2013.

Ad esempio, in uno studio condotto in Giappone, nella popolazione sopra i 60 anni più della metà dei soggetti testati si trovava in stadi di CKD dal 3 al 5, secondo le linee guida della *National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI)* (Iseki, 2005).

Un risultato simile è stato riscontrato negli Stati Uniti, in uno studio di Coresh e collaboratori, in cui è stata stimata la clearance della creatinina, risultata diminuita nel 46% della popolazione sopra i 70 anni. (Coresh *et al.*, 2003)

Ancora, Stevens e colleghi hanno applicato la nuova equazione CKD-EPI, sviluppata da Levey nel 2009, per stimare il GFR nei partecipanti sopra i 70 anni di età al "1999–2004 *National Health and Nutrition Evaluation Survey (NHANES)*": con questi criteri la prevalenza di CKD si attestava al 46,8%, contro il 6,71% della fascia di età di popolazione tra i 40 e i 59 anni (Stevens *et al.*, 2010).

In un recente studio, tuttavia, è stato evidenziato che sono i pazienti più giovani quelli a maggior rischio di progressione rapida ad una fase di *end-stage renal disease (ESRD)*.

Gli anziani, infatti, tendenzialmente muoiono prima di raggiungere questo stadio, si ritiene a causa della crescente importanza delle comorbidità (Sud *et al.*, 2014).

L'ESRD corrisponde allo stadio 5 di CKD, in base alle linee guida della K/DOQI per la classificazione della malattia renale cronica; in questo stadio il GFR è talmente diminuito che è necessario intraprendere una terapia di sostituzione renale, come la dialisi o il trapianto d'organo, per garantire la sopravvivenza del paziente (Bello *et al.*, 2010).

Genere

Secondo recenti dati raccolti sulla popolazione degli Stati Uniti, la fase terminale della malattia renale cronica avviene più frequentemente negli uomini che nelle donne (USRDS, 2010).

Questo dato non è però concorde con quanto riscontrato da Nitsch e colleghi nella loro analisi che raccoglieva dati di più di 2 milioni di partecipanti provenienti da ogni continente: gli autori hanno infatti constatato che gli uomini corrono un rischio più alto di morte a qualsiasi stadio di funzionalità renale, ma anche che il rischio di progredire ad ESRD è equivalente in uomini e donne. (Nitsch *et al.*, 2013)

Razza

Negli USA, gli Afroamericani hanno una velocità di progressione della CKD molto più elevata rispetto ai Caucasici. Il motivo di questa disparità non è ancora stato del tutto chiarito, ma è in parte spiegato da una maggiore prevalenza in questa etnia di ipertensione, obesità e diabete (Tarver-Carr *et al.*, 2002). Altre ipotesi che giustifichino l'aumentato rischio di un ESRD includono differenze razziali nel peso alla nascita, variazioni genetiche, povertà e differente accesso alle cure mediche (McClennan e Flanders, 2003)

Secondo Kiberd e Clase, l'ESRD negli Afroamericani causa una perdita di vita paragonabile al cancro colon-rettale e prostatico negli uomini, e una perdita quasi uguale a quella causata dal cancro del seno nelle donne. (Kiberd e Clase, 2002).

L'ultima analisi effettuata dall'*United States Renal Data System* (USRDS) ha evidenziato un calo nell'incidenza di ESRD negli ultimi cinque anni, sebbene essa continui a rimanere più elevata tra gli Afroamericani e i Nativi Americani rispetto ai Caucasici (Figura 2.2) (USRDS, 2013).

Genetica

È noto che la CKD ha una componente di ereditarietà, e che i fattori genetici hanno un ruolo cruciale in questa malattia e nella progressione ad ESRD.

Köttgen e colleghi hanno dimostrato che variazioni a carico del gene *TCF7L2*, noto per

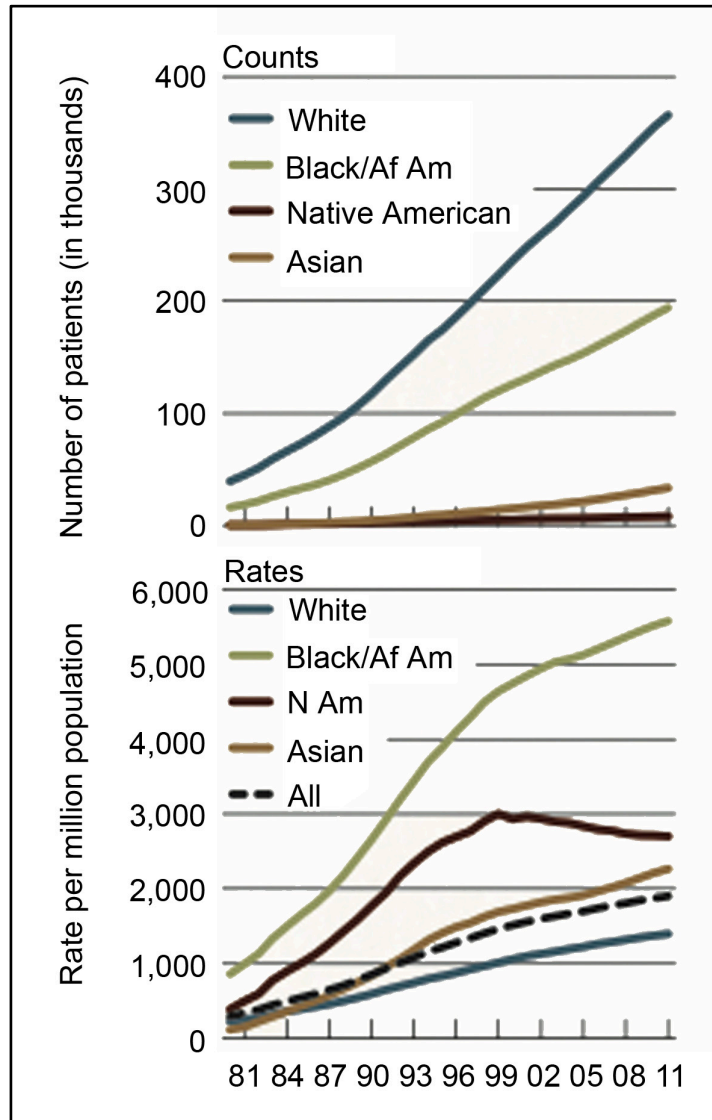


Figura 2.2: Rappresentazione grafica della prevalenza di ESRD negli Stati Uniti, in base alla razza. Gli Afro-Americani hanno un tasso di prevalenza quasi 5 volte maggiore rispetto ai Bianchi. *Modificato da USRDS, 2013.*

essere legato ad un aumentato rischio di sviluppare diabete mellito di tipo II, sono significativamente associate ad un peggioramento della CKD e dei *marker* di funzionalità renale, anche in individui non diabetici (Köttgen *et al.*, 2008).

Sempre Köttgen e colleghi hanno individuato delle mutazioni a carico del gene *UMOD*, che codifica la proteina Tamm-Horsfall, prodotta dal rene e fisiologicamente la più

abbondante nelle urine. Tali variazioni sono associate a differenze nella funzionalità renale (Köttgen *et al.*, 2009).

La genetica ha un ruolo importante anche per quanto riguarda le differenze di progressione della CKD tra Afroamericani e Caucasici. Uno studio recente ha valutato la presenza di due varianti, descritte solo tra individui di discendenza Africana, del gene *APOL1*: la presenza di entrambe le varianti comporta un aumento del rischio di peggioramento della CKD e di progressione ad ESRD, ed un calo del GFR più rapido (Parsa *et al.*, 2013).

Anche la familiarità deve essere considerata tra i fattori di rischio: un'anamnesi familiare in cui compaiano problemi di nefropatie avanzate comporta un rischio di sviluppo di ESRD da tre a nove volte maggiore, in particolare per gli Afroamericani (Satko *et al.*, 2007).

Perdita di parenchima renale

Numerosi studi recenti hanno sottolineato l'importanza di episodi di danno renale acuto (*Acute Kidney Failure - AKI*) nel declino della funzionalità renale. Ishani e collaboratori hanno valutato il rischio di progressione ad ESRD in pazienti anziani (oltre 67 anni di età) dopo un episodio di AKI, riscontrando che quasi il 7% sviluppava un stadio terminale di malattia renale dopo 2 anni, contro lo 0,49% di chi non aveva subito un danno renale acuto (Ishani *et al.*, 2009).

Il meccanismo sottostante non è ancora stato del tutto chiarito, ma secondo studi effettuati su modelli animali, è possibile che il sistema vascolare renale non sia del tutto efficiente nel rigenerarsi dopo un evento ischemico; questo comporterebbe alterazioni delle cellule endoteliali con conseguente perdita numerica di capillari, alterazioni nell'ossigenazione del rene e alterazioni emodinamiche che predispongono ad ipertensione e CKD (Basile, 2004). In particolare, l'ipossia stimola l'attività fibrogenica e la regolazione di fattori fibrogenici come il *transforming growth factor- β* (TGF- β), e ciò che ne consegue è lo sviluppo di fibrosi tubulointerstiziale (Johnson e Schreiner, 1997; Norman e Fine, 2006).

In un recente studio, eseguito su modelli animali, sono stati indagati alcuni dei meccanismi che causano danno renale conseguentemente a uno stato di disidratazione, ricorrente o cronica. Gli autori hanno, in particolare, dimostrato come l'iperosmolarità associata alla disidratazione sia causa di un'attivazione dell'aldosio reduttasi nella corticale renale, e quindi della formazione di fruttosio nel tubulo prossimale; il

metabolismo del fruttosio ad opera della fruttochinasi, però, porta alla formazione di chemochine e agenti ossidanti che causano un danno localizzato al tubulo ed infiammazione, portando quindi allo sviluppo precoce di fibrosi renale (Roncal Jimenez *et al.*, 2014).

2.2 Fattori modificabili

Ipertensione

L'ipertensione sistemica si riflette direttamente sul rene causando ipertensione a livello glomerulare, con conseguente distensione dei capillari del glomerulo: questo comporta un danno diretto alle cellule glomerulari (podociti), ed anche un danno di tipo funzionale sulla selettività della membrana glomerulare (Ruggenenti *et al.*, 2012). In queste particolari condizioni, infatti, è stata evidenziata la formazione di pori di dimensioni più grandi rispetto al normale, che lasciano passare una quantità maggiore di proteine plasmatiche (Gagliardini *et al.*, 2010). L'insieme di questi processi comporta dei cambiamenti a carico delle cellule mesangiali e delle cellule dei tubuli prossimali, che diventano immunocompetenti e secernono citochine, fattori di crescita e mediatori dell'infiammazione ed in ultimo causano la deposizione di tessuto connettivo e la progressione della fibrosi interstiziale e della glomerulosclerosi (Ljutić e Kes, 2003).

Per queste ragioni l'ipertensione sistemica è ritenuta essere sia causa che conseguenza della CKD. Alcuni studi hanno dimostrato che l'ipertensione è anche un importante fattore di rischio sia per lo sviluppo di malattia renale, che per un più rapido declino del GFR.

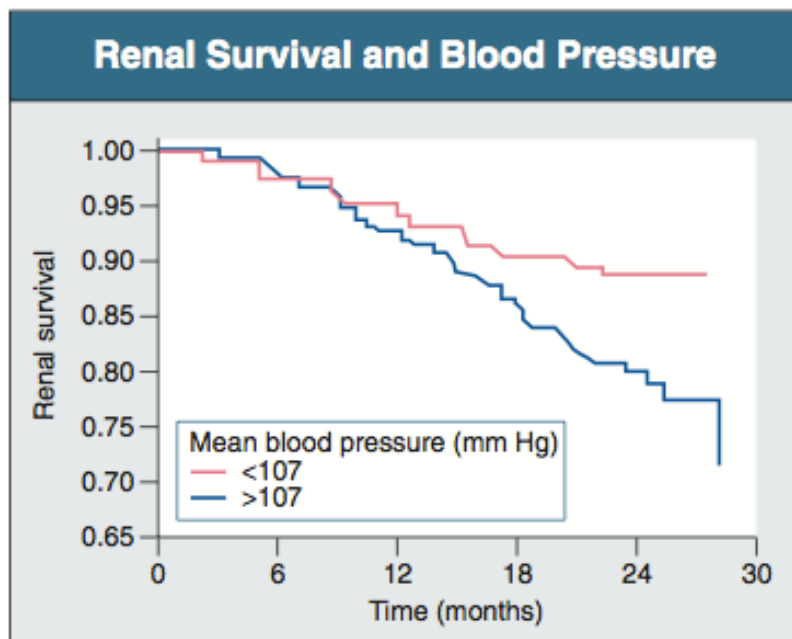


Figura 2.3: Tempi di sopravvivenza renale in base ai valori medi di pressione sistemica. Valori pressori medi superiori a 107 mmHg sono associati a una diminuita sopravvivenza. *Modificato da Bello et al., 2010.*

In una valutazione eseguita su 332445 uomini di età tra i 35 e i 57 anni, è stato concluso che il rischio di sviluppare ESRD inizia se i valori pressori superano 127/82 mmHg, aumentando progressivamente con il peggiorare dell'ipertensione. (Klag *et al.*, 1996). Un risultato concorde è stato ottenuto in Giappone, dove sono stati valutati 98579 soggetti, uomini e donne, per un periodo di 17 anni (Tozawa *et al.*, 2003). Una riduzione della pressione arteriosa in soggetti ipertesi è quindi un importante target per rallentare il declino del GFR e ridurre le possibilità di malattie cardiovascolari associate (Cravedi *et al.*, 2010).

Proteinuria

La proteinuria è un importante fattore di rischio per la progressione della CKD sia in pazienti diabetici che in non-diabetici. (Cravedi e Remuzzi, 2013). È stato dimostrato che la proteinuria comporta un maggior rischio di ESRD (Iseki *et al.*, 1996) e che è direttamente correlata ad una diminuzione del GFR (Ruggenenti *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2002). Inoltre, più la proteinuria è grave, più è rapido il declino della funzionalità renale e rapida la progressione ad uno stadio terminale di nefropatia (Figura 2.4) (Locatelli *et al.*, 1996; Ruggenenti *et al.*, 1998).

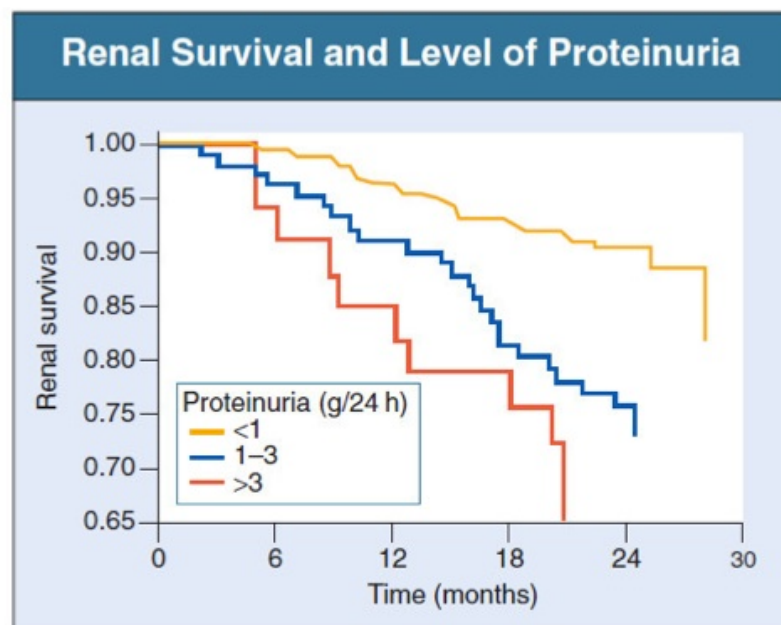


Figura 2.4: Tempi di sopravvivenza renale associati alla gravità della proteinuria. Modificato da Bello *et al.*, 2010.

I meccanismi sottostanti sono vari, ma principalmente quando la permselectività glomerulare viene compromessa si verifica un aumento delle proteine nell'ultrafiltrato,

con un sovraccarico delle cellule glomerulari e tubuloepiteliali; in queste circostanze i podociti rilasciano TGF- β che causa la differenziazione delle cellule mesangiali in miofibroblasti (Barnes e Gorin, 2011). Inoltre, studi *in vitro* hanno dimostrato che le cellule del tubulo prossimale, se esposte a proteine plasmatiche come albumina, IgG e transferrina, rilasciano delle molecole pro-infiammatorie e pro-fibrotiche (Abbate *et al.*, 2006).

In conseguenza di quanto detto, appare evidente che diminuire la proteinuria deve rappresentare un target terapeutico nel trattamento della CKD. Svariati studi hanno valutato come la riduzione della proteinuria abbia un effetto protettivo nei confronti della funzionalità renale e riduca la progressione della malattia renale, tra cui: il *Ramipril Efficacy in Nephrology* (REIN) nel 1997, il *Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan* (RENAAL) nel 2001, l'*African American Study of Kidney Disease and Hypertension* (AASK) nel 2002 (The GISEN Group 1997; Brenner *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2002). In particolare, la terapia più efficace è risultata essere quella con farmaci che agiscono sul sistema renina-angiotensina-aldosterone, ovvero ACE-inibitori e antagonisti del recettore per l'Angiotensina II (ARBs).

Più recentemente, de Goeij e colleghi hanno valutato il ruolo di queste molecole in un gruppo di pazienti pre-dialisi (CKD stadio IV-V), confermando nuovamente come la proteinuria, anche se di grado lieve ($>0,3\text{g/giorno}$ e $<1\text{g/giorno}$), causa una progressione più rapida della CKD, e che tale progressione è più rapida proporzionalmente alla gravità della proteinuria stessa. Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che i pazienti in trattamento, o che iniziano il trattamento con ACE inibitori/ARBs nel momento in cui entrano in pre-dialisi, sono sottoposti a terapia di sostituzione renale più tardivamente rispetto a chi non è in terapia con questi farmaci (de Goeij *et al.*, 2012).

Albuminuria, CKD e malattie cardiovascolari

La microalbuminuria, definita come rapporto albumina urinaria-creatinina urinaria (UAC) tra 30 e 300 $\mu\text{g/mg}$ (0.03-0,3 mg/g), è un fattore di rischio per lo sviluppo e la mortalità di malattie cardiovascolari (*Cardiovascular Disease* - CVD) e per ESRD, in individui con un profilo di rischio cardiovascolare sfavorevole come chi è affetto da ipertensione o diabete mellito. In uno studio condotto su 1568 soggetti non ipertesi e non diabetici è stato dimostrato che anche in queste categorie di pazienti l'albuminuria è associata con un aumentato rischio di CVD e mortalità, e che addirittura il rischio era presente per livelli di albuminuria al di sotto del limite considerato diagnostico (Ärnlov *et al.*, 2005).

L'albuminuria inoltre è stata associata con una diminuita elasticità vascolare, e si ritiene che disfunzioni endoteliali e infiammazione di basso grado possano essere i meccanismi che legano l'albuminuria alla rigidità vascolare e allo sviluppo di CVD (Hermans *et al.*, 2007).

Si ritiene ormai che pazienti umani affetti da CVD siano favoriti nello sviluppo di CKD, in parte per il fatto che queste patologie condividono alcuni fattori di rischio quali obesità, ipertensione e diabete mellito. In uno studio del 2009, che ha incluso 4380 soggetti sopra i 65 anni di età, è stato individuato un importante legame tra malattie cardiovascolari e malattia renale: l'insufficienza cardiaca e la presenza di aterosclerosi sono fortemente associate con una più rapida diminuzione della funzionalità renale. I meccanismi ipotizzati riguardano, nel primo caso, un'alterazione cronica del flusso sanguigno diretto al rene legato ad un diminuito output cardiaco, l'uso di diuretici ed un'eccessiva attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone; nel secondo caso, la possibile presenza di una sottostante malattia nefrovascolare (Shlipak *et al.*, 2009b).

Sistema renina-angiotensina

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) è conosciuto per i suoi effetti regolatori sulla pressione arteriosa e per il controllo dell'omeostasi e del bilancio elettrolitico attraverso un'azione coordinata su cuore, vasi e rene. L'angiotensina II (All) è il principale effettore del RAAS (Aros e Remuzzi, 2002). Quando la perfusione dell'apparato iuxtaglomerulare è diminuita, esso secreta la renina, che agisce sull'angiotensinogeno generando l'angiotensina I. Quest'ultima ha scarsi effetti sulla pressione sanguigna e viene convertita, a livello polmonare, tramite l'enzima di conversione dell'angiotensina I (ACE), in All, la quale agisce su cuore e reni legandosi a due tipi di recettori, AT1 e AT2. Sono i recettori AT1 a mediare gli effetti più dannosi dell'All, dando vasocostrizione e ipertrofia cardiaca e vascolare (Tabella 2.2.).

A livello renale, l'All provoca vasocostrizione delle arteriole glomerulari afferenti ed efferenti, agendo però maggiormente su quest'ultima e causando così un aumento della pressione intraglomerulare e alterazioni nella barriera di filtrazione, permettendo il passaggio di macromolecole, le cui conseguenze sono già state analizzate nel paragrafo sulla proteinuria (Remuzzi *et al.*, 2005).

L'All ha inoltre degli effetti non legati alle alterazioni dell'emodinamica, tra cui: aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno, di citochine, di fattori di crescita

profibrotici, di proteine di matrice extracellulare; stimolazione dell'attivazione e l'infiltrazione di macrofagi (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Aros e Remuzzi, 2002).

Infine, l'Ang II stimola la produzione di aldosterone da parte delle ghiandole surrenali.

L'aldosterone è un importante regolatore dell'omeostasi e dell'escrezione del potassio,

Tabella 2.2: Effetti dannosi dell'iperattivazione del RAAS.

Angiotensina II (sui recettori tipo 1)	Aldosterone
Effetti vascolari <ul style="list-style-type: none"> • Vasocostrizione e aterosclerosi • Ipertrofia vascolare (arteriolare) • Disfunzione endoteliale e iperaggregazione piastrinica 	Effetti vascolari <ul style="list-style-type: none"> • Fibrosi vascolare • Disfunzione endoteliale
Effetti cardiaci <ul style="list-style-type: none"> • Ipertrofia ventricolare sinistra • Fibrosi miocardica • Rimodellamento • Apoptosi 	Effetti cardiaci <ul style="list-style-type: none"> • Fibrosi miocardica
Effetti renali <ul style="list-style-type: none"> • Diminuzione della funzionalità renale • Proteinuria • Rilascio di Aldosterone • Sclerosi glomerulare • Fibrosi interstiziale 	Effetti renali <ul style="list-style-type: none"> • Ritenzione di sodio • Perdita di potassio • Perdita di magnesio
Altri effetti sistemici <ul style="list-style-type: none"> • Attivazione del sistema simpatico • Inibizione del parasimpatico • Potenziamiento degli effetti delle catecolamine 	Altri effetti sistemici <ul style="list-style-type: none"> • Attivazione del sistema simpatico • Inibizione del parasimpatico • Potenziamiento degli effetti delle catecolamine

media il rimodellamento vascolare e renale ed è stato recentemente riconosciuto come contributore nella patogenesi di danno renale e cardiaco (Hostetter, 2004).

Gli interventi terapeutici mirati a inibire il RAAS si sono dimostrati molto efficienti nel rallentare la progressione della CKD. In un recente studio, eseguito su oltre 140000 soggetti affetti da CKD, non in dialisi, la terapia con ACE inibitori/ARBs è stata associata ad un significativo aumento della sopravvivenza (Molnar *et al.*, 2014).

Diabete mellito

Il diabete mellito è la prima causa di ESRD negli Stati Uniti (USRDS 2013).

La malattia renale diabetica (*Diabetic Kidney Disease - DKD*), nota anche come nefropatia diabetica, è definita dalla presenza di proteinuria persistente clinicamente rilevabile, unita a elevata pressione arteriosa e diminuito GFR, e si stima che si sviluppi nel 25-40% dei malati di diabete, tipo 1 o tipo 2. Soggetti con DKD sono significativamente più a rischio di progredire ad ESRD, e di sviluppare, o morire per, malattie cardiovascolari (Maclsaac *et al.*, 2014).

Da un punto di vista fisiopatologico, lo sviluppo di nefropatia diabetica è legato a cause metaboliche, infiammatorie ed emodinamiche. Le cause metaboliche sono principalmente associate all'iperglicemia cronica, che induce un aumento dell'attività della proteina chinasi C, stimola la secrezione di citochine profibrotiche e la glicosilazione non enzimatica, con conseguente glicazione di proteine glomerulari e tubulari, e formazione di prodotti finali della glicazione. Da questi, vengono prodotte specie reattive dell'ossigeno (ROS) che, insieme a meccanismi infiammatori, hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo di DKD (Brownlee, 2001; Sheetz e King, 2002). I fattori emodinamici che contribuiscono alla DKD sono invece legati a ipertensione sistemica e intraglomerulare che si sviluppano conseguentemente all'attivazione del RAAS e del sistema delle endoteline.

Sebbene quindi sia ormai noto che la glicemia elevata svolge un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione della nefropatia diabetica, non è ancora stato del tutto chiarito se un buon controllo dei livelli glicemici possa rallentare il declino del GFR e l'avanzamento ad ESRD. A tal proposito sono stati effettuati diversi studi. Un sottostudio dell'ADVANCE (*Action in Diabetes and Cardiovascular Disease: Preterax and Diamicron Modified Release Controlled Evaluation*) ha mostrato che soggetti con diabete di tipo 2 sottoposti a uno stretto controllo della glicemia, avevano un rischio di sviluppare ESRD ridotto rispetto ai soggetti con controllo glicemico convenzionale (Perkovic *et al.*, 2013). Un risultato simile era stato ottenuto in pazienti con diabete di tipo 1 e manifesta proteinuria (Skupien *et al.*, 2012). In una meta-analisi del 2012, uno stretto controllo della glicemia in diabete di tipo 2 (definito da valori di emoglobina glicata <7%), se paragonato a un controllo convenzionale, è stato dimostrato ridurre il rischio di sviluppare microalbuminuria e macroalbuminuria; i dati riguardanti il rischio di progressione ad ESRD e il raddoppiamento dei valori di creatinina sono invece risultati non conclusivi nel paragone tra i due metodi di trattamento della glicemia (Coca *et al.*, 2012).

Obesità

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), l'obesità è una condizione caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso corporeo.

I meccanismi attraverso i quali l'obesità contribuisce alla CKD non sono ancora del tutto chiari, ma si suppone che il danno renale possa svilupparsi tramite fattori indiretti e diretti (Figura 2.5). Tra i meccanismi indiretti vengono inclusi condizioni coesistenti all'obesità, quali diabete mellito ed ipertensione; tra i diretti, alterazioni emodinamiche e ormonali che portano ad iperperfusion e iperfiltrazione glomerulare, principalmente per vasodilatazione dell'arteriola renale afferente. (Chagnac *et al.*, 2000; Henegar *et al.*, 2001). Il risultato di tali modificazioni è un aumento della pressione intraglomerulare, cui possono conseguire microalbuminuria, proteinuria, progressiva perdita della funzionalità renale ed infine ESRD. Campioni di biopsie renali hanno confermato l'esistenza di una glomerulopatia obesità-dipendente, caratterizzata da ipertrofia glomerulare e glomerulosclerosi focale segmentale (Kasiske e Crosson, 1986).

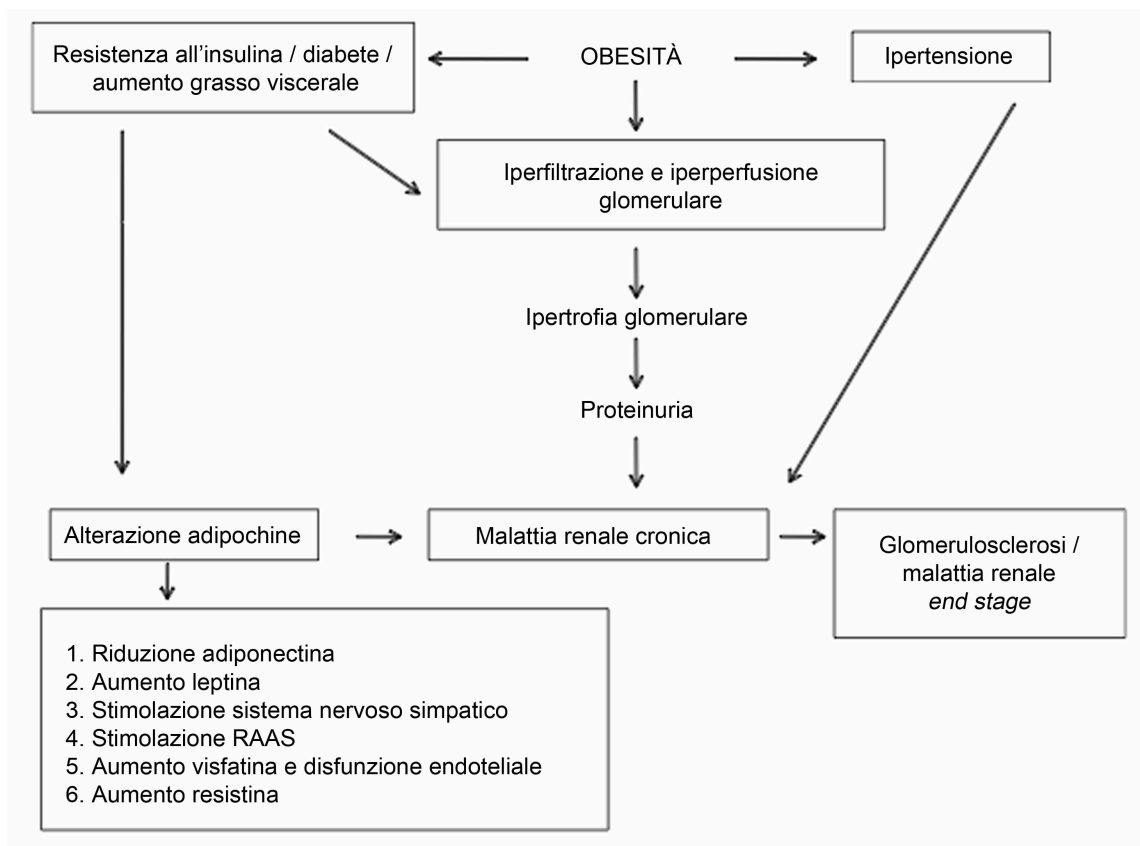


Figura 2.5: Rappresentazione dei meccanismi patofisiologici che conducono allo sviluppo di glomerulopatia obesità-dipendente. Modificato da Garland *et al.*, 2014.

Uno degli studi più importanti condotto sull'argomento è quello di Hsu e colleghi (Hsu *et al.*, 2006). Gli autori hanno considerato il rischio di sviluppare ESRD in 320252 soggetti dagli Stati Uniti, valutando un follow-up di 21 anni: se comparati con soggetti di peso normale, il rischio di progredire ad ESRD era quasi raddoppiato per i soggetti sovrappeso, e 7 volte maggiore per i soggetti obesi (Hsu *et al.*, 2006).

Recentemente è stato anche valutato come l'obesità influenzi la progressione della CKD. In uno studio su 125 soggetti in stadio 3-5 di CKD, tramite un'analisi multivariata è stato determinato che un aumento di 5 Kg/m² nell'indice di massa corporea (BMI) aumenta di quasi due volte, in 1 anno, il rischio di peggioramento della funzionalità renale (Garland *et al.*, 2013).

L'obesità è un importante fattore di rischio per la CKD anche in virtù della sua modificabilità. È stato osservato che la perdita di peso in pazienti obesi con proteinuria ha un importante effetto antiproteinurico: ad esempio, anche per perdite di peso inferiori al 5% del peso iniziale, la riduzione della proteinuria può arrivare fino al 30% rispetto ai valori basali (pre-dimagrimento) (Morales *et al.*, 2003).

Dislipidemia

La dislipidemia è associata alla CKD e alla sua progressione attraverso meccanismi che riguardano stress ossidativo, infiammazione sistemica e danno diretto alla membrana glomerulare (Vaziri, 2013).

Numerosi studi hanno mostrato come l'iperlipidemia sia un fattore di rischio per il peggioramento della CKD. Ad esempio, Bianchi e collaboratori hanno valutato l'associazione di atorvastatina e ACE inibitori o ARBs in soggetti con CKD e proteinuria: il gruppo trattato anche con la statina ha avuto una lieve ma non significativa riduzione del GFR dopo un anno di terapia; il gruppo non trattato invece ha subito un calo della funzionalità renale definito statisticamente significativo (Bianchi *et al.*, 2003).

Fumo

Numerosi studi hanno documentato come il fumo sia un fattore di rischio indipendente per la CKD sia per gli uomini che per le donne, in particolare nei forti fumatori e in chi è fortemente esposto ad esso (Orth e Hallan, 2008).

Fumare aumenta il rischio di sviluppare albuminuria: uno studio che ha coinvolto più di 28000 volontari, ha riscontrato che i fumatori hanno un forte rischio (rischio relativo 3.26) di sviluppare macroalbuminuria (Halimi *et al.*, 2000).

Il consumo di tabacco è anche legato alla progressione della CKD, così come provato in uno studio prospettico della durata di 20 anni che aveva come *end point* il raggiungimento di ESRD o la morte causata da malattia renale: il fumare ne è risultato associato con un *hazard ratio* di 2,4 per gli uomini e 2,9 per le donne (Haroun *et al.*, 2003).

I meccanismi che legano il fumo alla CKD sono molteplici e piuttosto complessi da interpretare, ma possono essere divisi in non-emodinamici ed emodinamici (Figura 2.6). Tra i primi si includono disfunzioni delle cellule endoteliali, attivazione di fattori di crescita (AII, TGF- β), effetti tubulo tossici, stress ossidativo, aumentata adesione piastrinica, alterazioni nel metabolismo delle lipoproteine (Orth, 2002; Odoni *et al.*, 2002). I meccanismi emodinamici riguardano invece l'aumento della pressione arteriosa, conseguente all'azione della nicotina, e le alterazioni vascolari a livello di rene, in particolare l'aumento della pressione glomerulare causata da un'inefficace autoregolazione renale (Orth, 2004).

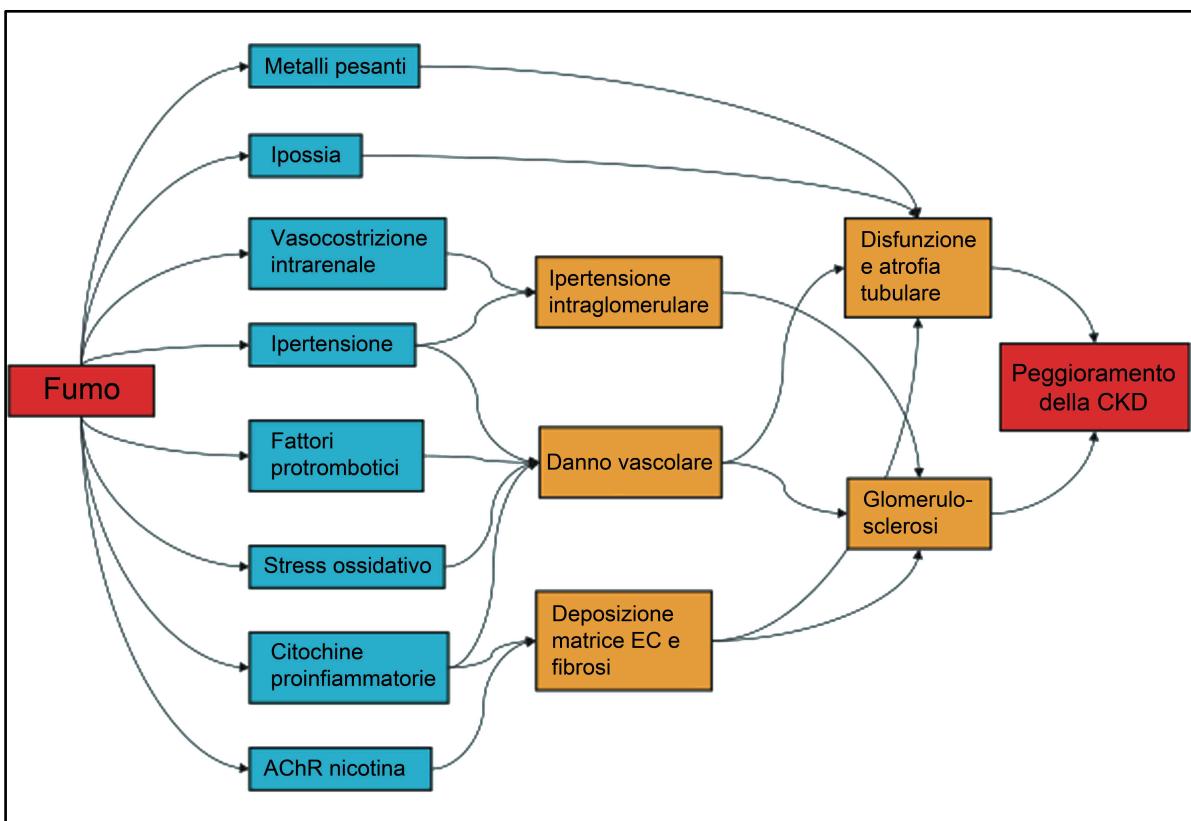


Figura 2.6: Rappresentazione di alcuni dei potenziali meccanismi causati dal fumo che inducono danno renale. *Modificato da Orth e Hallan, 2008.*

Capitolo 3

Fattori di rischio per lo sviluppo di CKD in medicina veterinaria

Come in medicina umana, anche in medicina veterinaria, in particolare nel cane e nel gatto, sono stati individuati dei fattori di rischio per lo sviluppo di malattia renale cronica. Tali fattori possono essere classificati in modo simile a quanto riportato nell'uomo, con una suddivisione in fattori di suscettibilità, scatenanti e di peggioramento.

È necessario tuttavia ricordare che in medicina veterinaria i dati relativi ai suddetti fattori di rischio sono scarsi rispetto a quelli presenti in medicina umana, e che una completa comprensione e analisi di tali fattori non è ancora stata conseguita. Di seguito sono pertanto riportati quelli maggiormente studiati e riconosciuti come fondamentali nello sviluppo di malattia renale cronica.

3.1 Fattori di suscettibilità

In questa categoria rientrano alcune delle condizioni che comportano un maggiore rischio di insorgenza di danno renale. Sebbene non siano state ancora del tutto chiarite, la capacità di individuarle sarebbe di grande valore nella prevenzione della CKD, come già avviene nella medicina umana.

Specie

La CKD viene diagnosticata più frequentemente nei gatti rispetto ai cani. Una stima della prevalenza di CKD nella popolazione canina e felina generale è di 0,5-1,5% nella prima e 1-3% nella seconda (Brown, 2007b).

Razza

Il collegamento più importante tra razza e sviluppo di CKD è rappresentato dalle nefropatie ereditarie. La maggior parte delle nefropatie familiari hanno un decorso progressivo e che conduce alla morte, anche se la velocità con cui progrediscono spesso varia molto tra individui affetti dalla stessa patologia. Nel cane, le principali sono

la displasia renale, le glomerulopatie primarie, l'amiloidosi, la malattia renale policistica e le glomerulonefriti immunomediate; nel gatto, la malattia renale policistica e l'amiloidosi (Lees, 2007).

Alcuni studi hanno riportato una maggiore prevalenza di CKD in gatti di razza Siamese, Abissina, Persiana, Maine Coon e Burmese (Lulich *et al.*, 1992; Boyd *et al.*, 2008). Questo dato non è però stato confermato in altre ricerche e rimane un'associazione poco significativa (White *et al.*, 2006; Paepe e Daminet, 2013).

Tabella 3.1: Nefropatie familiari nel cane e nel gatto.

	CANE	GATTO
Malattia renale policistica	Bull Terrier Cairn Terrier West Highland White Terrier	Persiano
Amiloidosi	Shar Pei English Foxhound Beagle	Abissino Siamese Orientale
Glomerulopatie primarie	Samoiedo Cocker Spaniel Inglese Bull Terrier Dalmata Dobermann Bull Mastiff Terranova Rottweiler Welsh Corgi Pembroke Beagle	
Displasia renale	Lhasa Apso Shih Tzu Barbone Soft-Coated Wheaten Terrier Chow-Chow Alaskan Malamute Schanuzer nano Golden Retriever	
Glomerulonefriti immunomediate	Soft-Coated Wheaten Terrier Pastore del Bernese	
Miste	Basenji (sindrome di Fanconi) Pastore Tedesco (cistoadenocarcinoma multifocale) Welsh Corgi Pembroke (telangectasia)	

Modificato da Lees et al., 2007

Età

La CKD può colpire animali di ogni età, ma la prevalenza è più elevata in animali anziani. Lo sviluppo di malattia renale cronica in soggetti giovani è di solito una conseguenza di nefropatie congenite (Polzin, 2011).

In un recente studio eseguito nel Regno Unito, gli autori hanno riscontrato che i cani sopra a 12 anni di età corrono un rischio 5 volte maggiore di sviluppare CKD, rispetto ai cani tra 7 e 12 anni (O'Neill *et al.*, 2013).

In una ricerca compiuta su dati raccolti dal *Veterinary Medical Data Base* dell'Università di Purdue tra il 1980 e il 1990, è risultato che il 37% dei gatti con diagnosi di insufficienza renale aveva meno di 10 anni, il 31% aveva tra 10 e 15 anni, il 32% aveva più di 15 anni (Lulich *et al.*, 1992). Anche uno studio del 1998 su gatti con CKD ha confermato questa tendenza: l'età media dei pazienti era di 12,6 anni con un *range* da 1 a 26 anni (Elliot e Barber, 1998).

Secondo un'analisi svolta in Australia su 184 gatti con malattia renale cronica, i maschi sviluppano la patologia prima delle femmine, ad un'età media rispettivamente di 12 anni e 15 anni (White *et al.*, 2006).

3.2 Fattori scatenanti

I fattori scatenanti causano direttamente il danno renale, e tra questi si annoverano patologie immunomediate, infezioni sistemiche, infezioni delle vie urinarie, nefrolitiasi, ostruzioni del tratto urinario, farmaci o nefrotossine, ipoperfusione renale cronica, amiloidosi. Tuttavia il reale contributo di questi fattori sull'incidenza della CKD in cani e gatti non è stato del tutto chiarito, principalmente perché le sottostanti cause di CKD vengono raramente diagnosticate al momento della diagnosi stessa della CKD (Polzin, 2011).

Tra le principali cause di danno renale, con una maggiore prevalenza nel cane rispetto al gatto, sono riconosciute le glomerulopatie: esse possono essere di natura congenita o acquisita, primarie o secondarie. In particolare, si ritiene che molte delle malattie glomerulari si sviluppino secondariamente a processi sistemici che possono essere neoplastici, infiammatori infettivi o non infettivi (Tabella 3.2) (Vaden, 2011).

Tabella 3.2: Patologie associate allo sviluppo di glomerulopatie in cane e gatto.

	CANE	GATTO
Neoplastiche	Leucemia Linfoma Mastocitosi Eritrocitosi primaria Istiocitosi sistemica Altre neoplasie	Leucemia Linfoma Mastocitosi Altre neoplasie
Infettive batteriche	Borrelliosi Bartonellosi Brucellosi Endocardite Pielonefrite Piometra Piodermite Altre infezioni batteriche croniche	Infezioni batteriche croniche Poliartrite da Micoplasma
Infettive protozoarie	Babesiosi Epatozoonosi Leishmaniosi Tripanosomiasi	
Infettive da rickettsie	Ehrlichiosi	
Infettive virali	Adenovirus canino tipo 1	Virus dell'immunodeficienza felina (FIV) Peritonite infettiva felina (FIP) Virus della leucemia felina (FELV)
Infettive parassitarie	Dirofilariosi	
Infettive micotiche	Blastomicosi Coccidiomicosi	
Infiammatorie	Dermatite cronica Malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) Pancreatite Malattie periodontali Lupus sistemico eritematoso Altre patologie immunomediate	Pancreatite Colangioepatite Poliartrite cronica progressiva Lupus sistemico eritematoso Altre patologie immunomediate
Altre cause	Eccessiva somministrazione di corticosteroidi Trimetoprim-sulfa Iperlipidemia Infusione cronica di insulina Ematopoiesi ciclica nel Collie Vaccinazioni eccessive Idiopatiche	Tossicità da mercurio Idiopatiche

Modificato da Vaden, 2011

3.3 Fattori di peggioramento

Questi fattori causano il peggioramento di un pre-esistente danno renale, favorendo e accelerando il declino della funzionalità renale, e sono quindi correlati alla progressione della CKD.

Ipertensione sistemica

L'ipertensione sistemica è una comune conseguenza della malattia renale, in particolare modo nella CKD. Alcuni studi hanno dimostrato che la percentuale di pazienti in cui si presenta un aumento della pressione arteriosa in corso di malattia renale cronica varia tra il 19,4% e il 61% nei gatti, e il 50 e il 93% nei cani (Kobayashi *et al.*, 1990; Bartges *et al.*, 1996; Syme *et al.*, 2002).

Inoltre, così come in medicina umana, anche in veterinaria l'ipertensione arteriosa è causa di peggioramento della CKD, attraverso vari meccanismi. Uno dei processi che maggiormente contribuiscono a tale peggioramento, studiato in particolare sui ratti, è la trasmissione dell'ipertensione sistemica al letto capillare glomerulare, cui consegue un danno al glomerulo: questa circostanza è particolarmente importante in soggetti con preesistente danno renale perché in essi si verifica un'alterazione nella regolazione del flusso sanguigno al glomerulo, regolazione che normalmente dovrebbe proteggere i capillari da un'eccessiva pressione (Bidani e Griffin, 2002). Alcuni studi effettuati su cani e gatti hanno confermato che una ridotta funzionalità renale è associata a vasodilatazione preglomerulare, la quale permette la trasmissione dell'ipertensione sistemica ai capillari glomerulari (Brown *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997).

L'eccessiva pressione arteriosa a livello renale comporta degenerazione tubulare e fibrosi interstiziale; inoltre, a livello glomerulare, si riscontrano glomerulosclerosi, atrofia glomerulare e glomerulite proliferativa. L'insieme di queste alterazioni è associato a iperfiltrazione glomerulare e ulteriore danno a carico delle suddette strutture (Bartges *et al.*, 1996).

In uno studio del 2004, gli autori hanno indotto una condizione di insufficienza renale in 19 cani per studiare le conseguenze dell'ipertensione sulla funzionalità e la morfologia renale, dimostrando, nel corso dello studio, che i soggetti con pressione arteriosa più elevata arrivavano ad un GFR inferiore, valori di proteinuria più elevati, e lesioni renali più gravi (Finco, 2004).

Risultati concordi con quanto riportato finora sono stati ottenuti anche da Jacob e collaboratori, i quali, tramite la valutazione della pressione arteriosa di 45 cani, hanno dimostrato che i soggetti con pressione arteriosa più elevata al momento della diagnosi di CKD corrono un rischio maggiore di sviluppare delle crisi uremiche e morire per cause renali, e subiscono un declino della funzionalità renale più rapido, rispetto a soggetti con pressione arteriosa inferiore (Figura 3.1) (Jacob *et al.*, 2003).

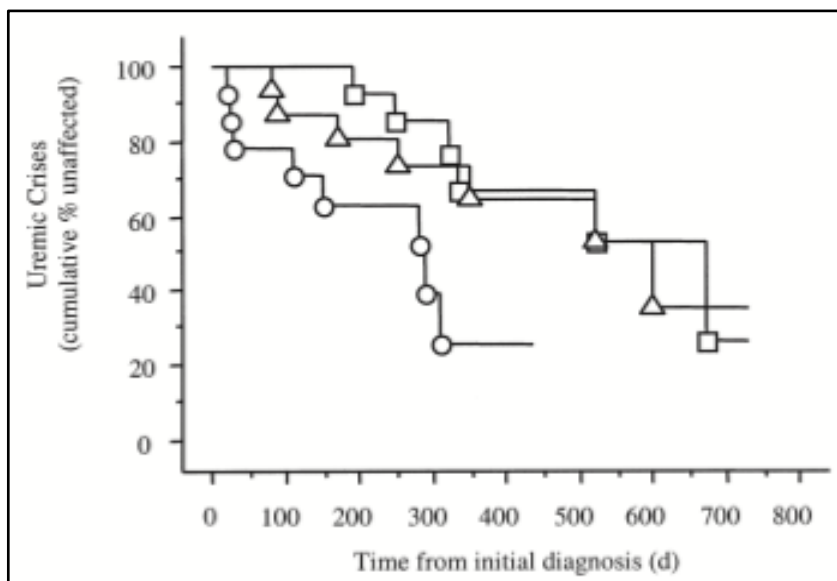


Figura 3.1: Curva Kaplan-Meier che mostra il tempo di sviluppo di una crisi uremica in cani CKD, suddivisi in base ai valori di pressione arteriosa al momento della diagnosi. I cerchi indicano valori pressori elevati (*range* da 161 a 201 mmHg), i quadrati valori pressori intermedi (*range* da 144 a 160 mmHg), i triangoli valori pressori bassi (*range* da 107 a 143 mmHg). *Modificato da Jacob et al.*, 2003.

Proteinuria

In medicina umana, come già illustrato in precedenza, la proteinuria è legata alla progressione della malattia renale cronica. Negli ultimi decenni questa evidenza è stata dimostrata anche in medicina veterinaria attraverso svariati studi.

Una ricerca condotta su 45 cani con CKD ha riscontrato che il rischio relativo di avere una crisi uremica o di morire, era 3 volte maggiore in soggetti con proteinuria patologica e UPC >1,0 rispetto a soggetti con UPC <1,0. Inoltre, più grave era la proteinuria, maggiore era la riduzione della funzionalità renale (Jacob *et al.*, 2005).

In uno studio del 2008, gli autori hanno valutato il legame tra funzionalità renale e proteinuria, misurando la *clearance* di creatinina esogena in 60 cani: i risultati ottenuti hanno mostrato una debole, seppur significativa, associazione tra la diminuzione della

funzionalità renale e l'aumento della proteinuria. Nella stessa ricerca è stata anche valutata la sopravvivenza in soggetti con CKD, rivelando che cani con proteinuria moderata ($UPC \geq 1$) avevano un tempo di sopravvivenza significativamente più breve. Un grado di proteinuria meno grave ($UPC \geq 0,5$ e $< 1,0$), invece, non è stato associato con tempi minori di sopravvivenza (Wehner *et al.*, 2008).

I risultati ottenuti dalle ricerche effettuate sulla specie felina sono concordi con quanto dimostrato nel cane. Uno studio condotto su 136 gatti ha rilevato che un grado di proteinuria patologico, seppure di lieve entità, è associato con un più elevato rischio di morte o eutanasia (Figura 3.1) (Syme *et al.*, 2006).

Più recentemente, Chakrabarti e collaboratori hanno riscontrato che un UPC elevato è associato al peggioramento della malattia renale cronica: un aumento di 0,1 nei valori di UPC comporta un aumento del 25% nel rischio di progressione della CKD (Chakrabarti *et al.*, 2012).

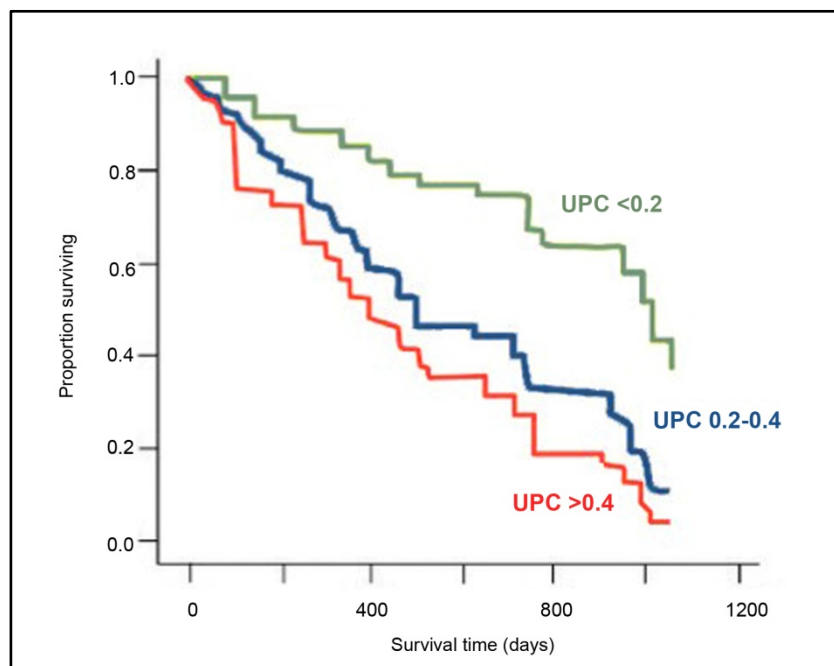


Figura 3.2: Curva di sopravvivenza in 136 gatti, suddivisi in base al valore di UPC.
Modificato da Syme et al., 2006

Le proteine ultrafiltrate vengono normalmente riassorbite dal tubulo prossimale. Quando la barriera di filtrazione glomerulare viene danneggiata, la quantità eccessiva di proteine presenti nell'ultrafiltrato può accumularsi all'interno delle cellule epiteliali del tubulo prossimale, facendo sì che queste cellule secernano citochine nel comparto interstiziale. È tramite questo meccanismo che la proteinuria è stata associata con il peggioramento

della CKD. Tuttavia, poiché questi meccanismi sono stati studiati prevalentemente su roditori ai quali è stata indotta sperimentalmente una grave proteinuria, è possibile che essi non rappresentino in maniera adeguata ciò che avviene nei casi di lieve proteinuria che si riscontrano nella pratica veterinaria in soggetti colpiti da CKD, in particolare nel gatto (Syme *et al.*, 2006; Chakrabarti *et al.*, 2012).

Iperfosfatemia

La prevalenza dell'iperfosfatemia è elevata in soggetti con CKD: una ricerca del 2010 ha analizzato le alterazioni del metabolismo calcio-fosforo in 54 cani in diversi stadi IRIS di CKD, riscontrando che il 68,5% dei soggetti aveva elevate concentrazioni sieriche di fosforo (Figura 3.3) (Cortadellas *et al.*, 2010). Le conseguenze principali della ritenzione di fosforo e dell'iperfosfatemia sono il peggioramento della CKD, lo sviluppo di iperparatiroidismo secondario renale e la comparsa di osteodistrofia renale (Polzin, 2011).

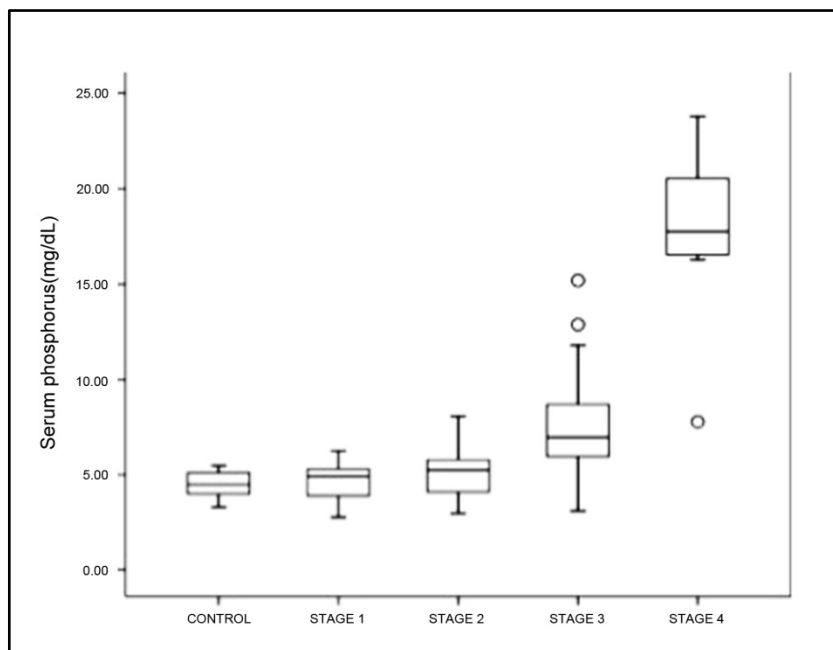


Figura 3.3: Comparazione della concentrazione sierica di fosforo in cani controllo e in cani a diverso stadio IRIS di CKD. Modificato da Cortadellas *et al.*, 2010.

Nel gatto, elevate concentrazioni sieriche di fosforo sono state associate con diminuiti tempi di sopravvivenza nei soggetti con CKD (Figura 3.4) (King *et al.*, 2007; Boyd *et al.*, 2008). Un recente studio ha riscontrato che il fosforo è un fattore prognostico indipendente per il peggioramento della CKD: un aumento di 0,99 mg/dl del fosforo

inorganico plasmatico è stato associato in maniera indipendente con un aumento del 41% del rischio di peggioramento, dove per peggioramento si considerava un aumento di almeno il 25% nel valore della creatinina sierica (Chakrabarti *et al.*, 2012).

Nella specie canina, i principali studi effettuati sono stati condotti su soggetti parzialmente nefrectomizzati in modo da indurre una condizione di CKD; a questi soggetti sono stati somministrati diversi tipi di diete, che differivano per il contenuto proteico e in fosforo. Gli autori hanno rilevato che la riduzione di fosforo nella dieta era associata a una progressione più lenta della malattia renale, e un'aumentata sopravvivenza (Brown *et al.*, 1991; Finco *et al.*, 1992).

Si ipotizza che il fosforo possa favorire il peggioramento della CKD, almeno in parte, attraverso la precipitazione con il calcio nell'interstizio renale. Questa mineralizzazione intrarenale potrebbe avviare una reazione infiammatoria che esita in ulteriore fibrosi renale interstiziale e atrofia tubulare (Polzin, 2011).

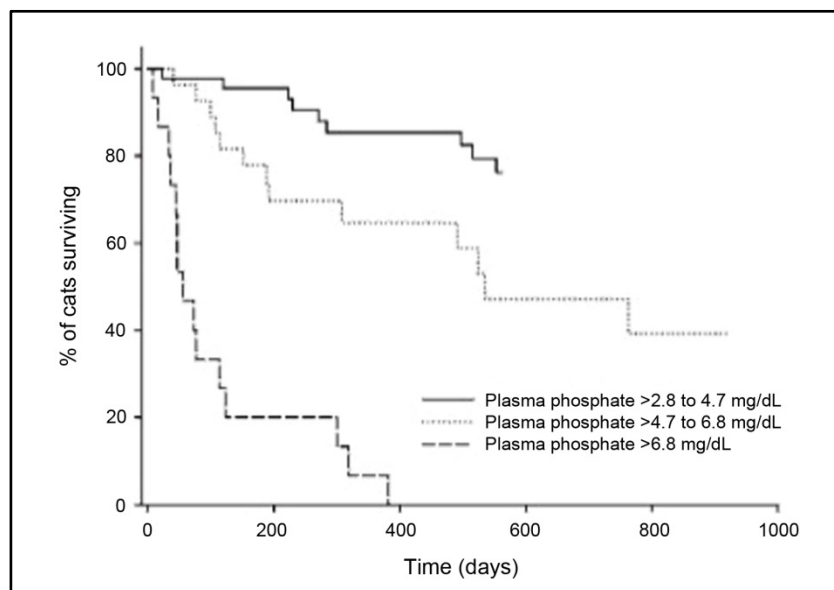


Figura 3.4: Grafico Kaplan-Meier che mostra la sopravvivenza di gatti CKD in base alla concentrazione sierica di fosforo al momento della diagnosi. Modificato da King *et al.*, 2007.

Capitolo 4

Terapia della malattia renale cronica in medicina veterinaria

Il trattamento terapeutico della CKD dovrebbe essere sviluppato specificatamente per ciascun paziente, in base alla diagnosi di nefropatia, lo stadio IRIS, la presenza di complicazioni o comorbidità e l'esistenza di fattori di rischio per il peggioramento della funzionalità renale.

La terapia si basa quindi sul trattamento della causa sottostante la malattia renale, nel caso sia stato possibile individuarla; sulla prevenzione e la gestione delle complicazioni associate alla diminuzione della funzionalità renale, tramite una corretta diagnosi e una terapia sintomatica e di supporto; sulla gestione di patologie concomitanti, come infezioni delle vie urinarie, patologie periodontali, malattie cardiache ed infine sulla ricerca di una terapia che possa rallentare la perdita progressiva di funzionalità renale (Polzin, 2011).

4.1 Terapia dietetica

L'utilizzo di diete specifiche è uno dei punti cardine nel trattamento della CKD. Le cosiddette diete renali sono formulate con ridotto contenuto di proteine, fosforo e sodio, ed aumento nel contenuto di vitamina B, delle calorie e della fibra solubile rispetto alle normali diete di mantenimento, e sono inoltre supplementate con acidi grassi e antiossidanti.

Il diminuito contenuto proteico è giustificato dall'associazione tra elevata assunzione giornaliera di proteine con la dieta, ritenzione di prodotti di scarto del catabolismo proteico, e lo sviluppo di segni clinici di uremia. Non è chiaro tuttavia se la sola restrizione proteica dietetica sia effettivamente in grado di limitare la progressione della CKD in cani e gatti, anche se esistono alcune evidenze scientifiche che supportano tale ipotesi (Polzin, 2011).

La possibilità di mantenere un adeguato apporto calorico è fondamentale per evitare un aumento del catabolismo proteico endogeno. L'energia in questo tipo di diete è fornita in particolare dai grassi, che, apportando più elevate quantità di energia per grammo rispetto ai carboidrati, permettono il raggiungimento dei requisiti nutrizionali in piccoli

quantitativi di cibo. Fornire porzioni di piccole dimensioni permette di evitare la distensione delle pareti dello stomaco che può contribuire alla nausea e all'insorgere di vomito (Elliott, 2006).

La dieta renale è consigliata nei cani con CKD in stadio IRIS 3 e 4, e nei gatti a partire dallo stadio 2. Poiché è stato dimostrato che una ideta renale riduce la gravità della proteinuria, tali diete sono raccomandate anche nei cani affetti da malattia renale proteinurica (Lees *et al.*, 2005). La somministrazione di questa tipologia di dieta in pazienti CKD è stata inoltre correlata in alcuni studi alla riduzione delle crisi uremiche e ad un prolungato tempo di sopravvivenza sia nei cani che nei gatti (Jacob *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2006).

4.2 Gestione della sintomatologia gastroenterica

Sintomi gastroenterici quali diminuzione dell'appetito, nausea, vomito, stomatite e ulcere gastrointestinali sono piuttosto comuni in pazienti CKD in stadio 3 e 4, e il loro trattamento è soprattutto sintomatico. La riduzione dell'apporto proteico con la dieta può migliorare alcuni segni legati all'uremia. L'utilizzo di antagonisti dei recettori H₂ o di inibitori di pompa protonica è indicato per ridurre l'acidità gastrica; se anoressia, nausea e vomito persistono nonostante questo trattamento, è possibile utilizzare degli antiemetici. In caso di sospetto di ulcere o emorragie gastrointestinali è invece utile il sucralfato o una terapia combinata tra questi presidi.

4.3 Terapia dell'iperfosfatemia

Gli ottimali *range* di fosfatemia in corso di CKD sono stati indicati dall'IRIS (Tabella 4.1) e il trattamento terapeutico dovrebbe iniziare quando il limite superiore di tale *range* viene superato. Lo scopo principale della terapia è quello di minimizzare la ritenzione di fosforo e l'iperfosfatemia nel lungo periodo, e può essere raggiunto limitando l'apporto di fosforo con la dieta e/o somministrando dei chelanti del fosforo.

Solitamente la terapia inizia con la restrizione dietetica del fosforo, che si rende necessaria in corso di CKD poiché la fosfatemia è il risultato del bilancio tra l'apporto con la dieta e l'escrezione renale: con il declino della funzionalità renale diminuisce l'eliminazione del fosforo, e conseguentemente è necessario limitarne l'*intake*.

Se dopo 2-4 settimane di dieta i *target* terapeutici non vengono raggiunti, è necessario associare i chelanti orali del fosforo, che agiscono a livello intestinale promuovendo la formazione di sali di fosforo non assorbibili attraverso il lume gastroenterico (Polzin, 2011).

Tabella 4.1: Target terapeutici della fosfemia in base allo stadio IRIS.

Stadio IRIS	Fosfemia (mg/dl)
2	2,5 – 4,5
3	2,5 – 5,0
4	2,6 – 6,0

Modificato da Geddes et al., 2013

4.4 Terapia con calcitriolo

I pazienti con CKD hanno di solito dei bassi livelli di calcitriolo. Negli stadi iniziali di malattia renale cronica, è possibile che il ridotto apporto di fosforo con la dieta possa contribuire a correggere i livelli di questo ormone; tuttavia, con il peggioramento della nefropatia, le evidenze scientifiche suggeriscono di instaurare una terapia con calcitriolo. È stato infatti riscontrato che questa terapia riduce la mortalità in pazienti con stadio IRIS 3 e 4, rallentando la progressione della CKD (Polzin, 2011). Prima di iniziare il trattamento, i livelli di fosforo sierico dovrebbero essere all'interno dei *range* descritti precedentemente, e il calcio ionizzato dovrebbe rientrare nei *range* fisiologici.

4.5 Terapia dell'acidosi metabolica

L'acidosi metabolica è una complicazione piuttosto frequente della malattia renale cronica. Al momento, in veterinaria, non sono presenti studi che confermino che un'appropriata terapia alcalinizzante ha un effetto benefico sulla sopravvivenza o sulla progressione della CKD, perciò questa terapia viene intrapresa basandosi su dati fisiopatologici e sulle linee guida per il trattamento della CKD in medicina umana. Tra i potenziali effetti benefici sono inclusi il miglioramento della sintomatologia causata dall'acidosi uremica, la possibilità di prevenire gli effetti dell'acidosi sul catabolismo proteico e la riduzione delle alterazioni a carico dell'apparato scheletrico conseguenti al rimodellamento osseo (Mitch, 1997; Adrogue e Madias, 1998).

Le diete renali hanno un effetto neutralizzante sull'acidosi, e inizialmente la loro somministrazione può essere sufficiente per correggere l'acidosi metabolica. Se, dopo

alcune settimane, il pH ematico rimane inferiore rispetto ai livelli fisiologici, è opportuno iniziare una terapia con agenti alcalinizzanti come il sodio bicarbonato o il citrato di potassio (Polzin, 2011).

4.6 Idratazione

La poliuria è uno dei primi segni clinici che si riscontrano in pazienti con CKD; viene compensata, per mantenere un adeguato bilancio dei fluidi, dalla polidipsia. Se il consumo di liquidi non è adeguato, ad esempio per mancato accesso ad acqua di buona qualità, o se l'animale presenta delle condizioni che possono aumentare la perdita di liquidi come ipertermia, vomito, o diarrea, è possibile che il paziente vada incontro a disidratazione. La disidratazione cronica può causare anoressia, abbattimento, costipazione, iperazotemia pre-renale, e soprattutto può predisporre ad uno danno renale acuto.

A seconda della gravità della disidratazione e delle condizioni del paziente si può optare per la somministrazione di fluidi bilanciati elettroliticamente, come il Ringer lattato o la soluzione fisiologica, per via endovenosa o sottocutanea. La fluidoterapia sottocutanea viene indicata soprattutto in pazienti che si disidratano con una certa ricorrenza, o in quelli che hanno ormai raggiunto stadi finali di CKD; è particolarmente utile nel gatto, poiché in questa specie spesso la polidipsia compensatoria non riesce ad essere adeguata.

La somministrazione di fluidi anche per via sottocutanea non è priva di effetti collaterali: se inappropriata, può indurre ipernatremia, ipokaliemia, ipertensione arteriosa e sovraccarico di liquidi o iperidratazione (Polzin, 2010).

4.7 Terapia della proteinuria

La proteinuria è un fattore di rischio per il peggioramento della CKD ed è stata associata ad un'aumentata mortalità (Jacob *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2006). In medicina umana, la riduzione della proteinuria è correlata a un rallentamento nella progressione della malattia renale cronica e ad una minore mortalità (Abbate *et al.*, 2006).

Le linee guida dell'IRIS per il trattamento della proteinuria indicano che la terapia dovrebbe essere intrapresa in cani e gatti in stadio 1 con UPC > 1,0 (gatto) e > 2,0

(cane), e in pazienti in stadio 2-4, con UPC > 0,4 (gatto) e > 0,5 (cane). Rimane comunque indicato, per ogni stadio, eseguire un monitoraggio della proteinuria se *borderline* (www.iris-kidney.com).

La terapia standard prevede la somministrazione di dieta renale e di farmaci ACE inibitori ed il *target* terapeutico è il dimezzamento dell'UPC o, idealmente, il raggiungimento di valori normali.

In medicina umana, il trattamento con ACE inibitori è spesso associato ad antagonisti dei recettori dell'angiotensina II (ARBs) e/o antagonisti dei recettori dell'aldosterone, come lo spironolattone (Figura 4.1). In medicina veterinaria, la terapia combinata non è ancora stata sufficientemente studiata, tuttavia l'uso di ARBs potrebbe rivelarsi di scarso interesse poiché queste molecole non vengono metabolizzate in forma attiva nel cane e hanno quindi un'azione molto limitata (Papich, 2007).

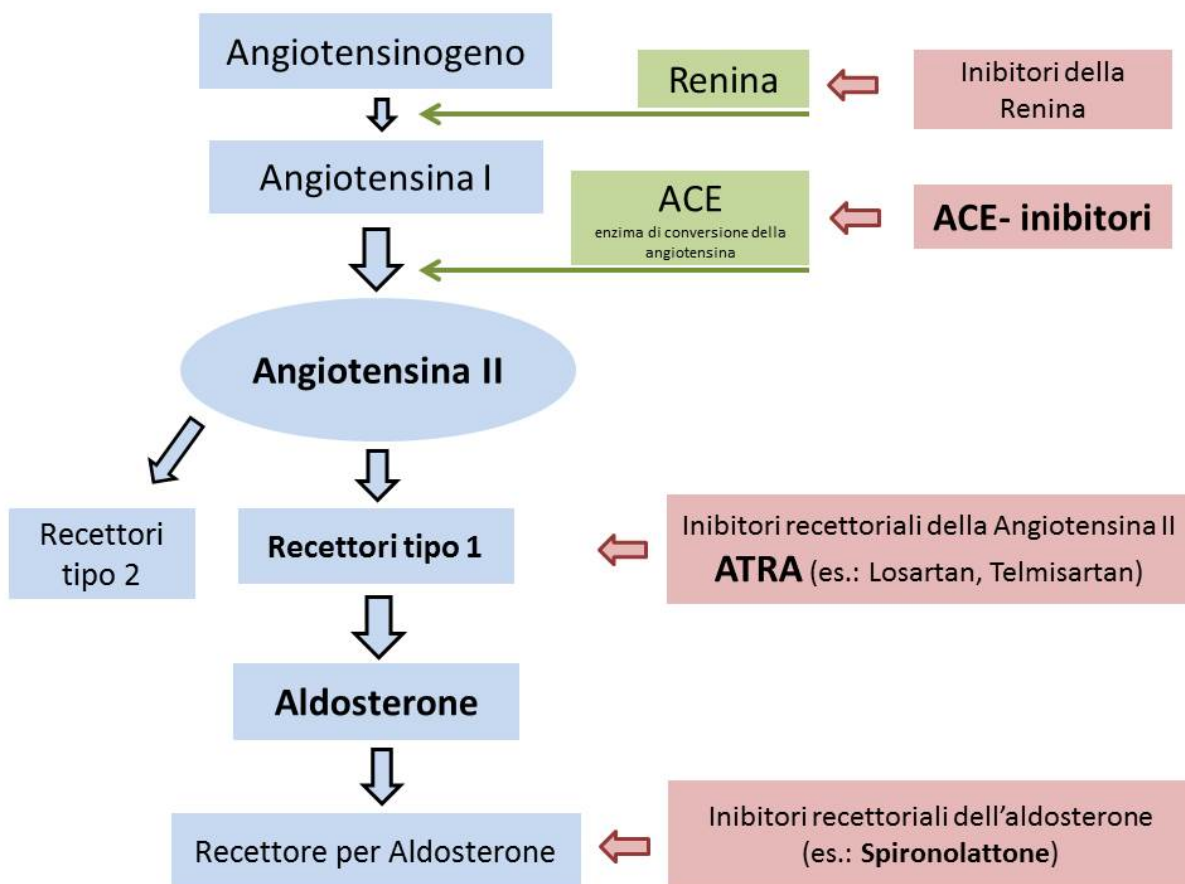


Figura 4.1: Rappresentazione delle categorie di farmaci utilizzati nell'inibizione del RAAS e del loro rispettivo sito di azione.

L'ACE inibitore agisce riducendo l'azione dell'angiotensina II che causa vasocostrizione intrarenale, ed ha inoltre un effetto vasodilatatore sull'arteriola efferente, permettendo quindi di diminuire le resistenze intraglomerulari e di ripristinare un normale GFR (Figura 4.2) (Chew *et al.*, 2011).

Il ruolo dei farmaci antagonisti dei recettori dell'aldosterone deve essere ancora approfondito in veterinaria, ma ci sono evidenze che, in associazione con ACE inibitori, possa avere un effetto nefroprotettivo (Epstein, 2001).

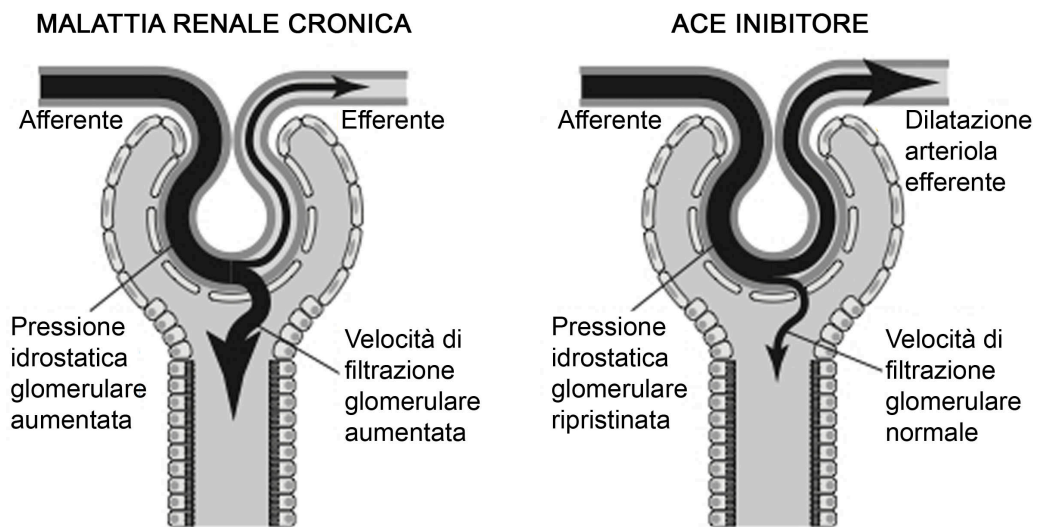


Figura 4.2: La figura illustra l'effetto dell'ACE inibitore sui flussi glomerulari. A sinistra è rappresentato il "super nefrone" caratterizzato da aumentato GFR; a destra, l'effetto dell'ACE inibitore permette il ripristino di un normale GFR. *Modificato da Chew et al., 2011.*

Alcuni studi hanno infatti definito l'aldosterone come un fattore patogenetico indipendente nella progressione della CKD: esso sembra promuovere il danno renale tramite alterazioni dell'emodinamica e sembra avere delle proprietà fibrogeniche, promuovendo la produzione del TGF- β a livello renale (Epstein, 2001; Ibrahim e Hostetter, 2001).

4.8 Terapia dell'ipertensione arteriosa

L'ipertensione arteriosa sistemica è piuttosto frequente in corso di CKD ed è associata allo sviluppo di complicazioni renali, oculari, cardiache e neurologiche.

In medicina umana la riduzione della pressione arteriosa riduce anche il rischio di *target-organ damage*. In medicina veterinaria, questa evidenza è stata riscontrata nei gatti (Kyles *et al.*, 1999; Mathur *et al.*, 2002) ma non nei cani; tuttavia, l'elevata pressione

arteriosa sistemica è stata associata all'aumento della proteinuria, e questo riscontro da solo giustifica l'intraprendere il trattamento per ridurre l'ipertensione stessa (Polzin, 2011).

La terapia dovrebbe essere iniziata nei pazienti CKD in stadio IRIS 1 con pressione arteriosa maggiore di 180/120 mmHg, e nei pazienti in stadio 2-4 con pressione arteriosa al di sopra di 160/100 mmHg, poiché questi soggetti, essendo iperazotemici, corrono un rischio maggiore di sviluppare *target-organ damage* conseguentemente all'ipertensione (www.iris-kidney.com). A meno che non vi sia evidenza di danno acuto da ipertensione a carico dell'occhio e del sistema nervoso, non è necessaria una rapida riduzione della pressione arteriosa, e tendenzialmente il controllo ottimale viene raggiunto velocemente nei gatti, e nel corso di settimane o mesi nei cani.

Il valore ottimale di pressione arteriosa che dovrebbe essere raggiunto grazie alla terapia non è stato ancora definito, ma, nella pratica, valori inferiori a 150/95 mmHg possono essere un valido *target*.

I farmaci più utilizzati per la riduzione dell'ipertensione sono gli ACE inibitori e i calcio-antagonisti: entrambi agiscono sull'emodinamica renale, anche se con meccanismi diversi, e possono avere un effetto nefroprotettivo (Polzin, 2011).

4.9 Terapia dell'anemia

I pazienti CKD sviluppano anemia da cause multifattoriali che, in genere, si aggrava con il peggiorare della malattia renale.

La carenza di ferro è una causa di anemia piuttosto comune, ma non è chiaro se sia principalmente attribuibile ad un apporto inadeguato o alle emorragie croniche gastroenteriche. La supplementazione di ferro tramite solfato ferroso o ferro destrano può correggerne la carenza ed è inoltre indicata nella terapia con eritropoietina per sostenere la maggiore produzione di globuli rossi.

La malnutrizione potrebbe causare anemia tramite la carenza di riboflavina (vitamina B2), cobalamina (vitamina B12) e folati, ma i livelli di queste sostanze non possono essere facilmente determinati nella pratica veterinaria e queste carenze possono essere solo sospettate in pazienti anoressici o con malassorbimento. Anche la malnutrizione proteica, tramite alterazioni degli aminoacidi e delle concentrazioni di ormoni, è indicata come causa di eritropoiesi subottimale e anemia. Le carenze nutrizionali possono essere facilmente corrette e prevenute tramite la prescrizione di diete renali (Polzin, 2010).

La terapia più efficace per correggere l'anemia consiste nella sostituzione ormonale dell'eritropoietina (EPO). Questo trattamento è molto utilizzato in medicina umana, ma presenta dei limiti in veterinaria. L'eritropoietina ricombinate umana (rHuEPO) differisce strutturalmente da quella canina e felina e la sua somministrazione nella pratica veterinaria comporta lo sviluppo di anticorpi anti-EPO che la rendono inefficace e che, con il passare del tempo, potrebbero rendere l'EPO endogena del paziente inutile, costringendolo a dipendere dalle trasfusioni. L'EPO ricombinante canina si è dimostrata valida nel ridurre l'anemia di cani CKD, ma non nel correggere l'aplasia dei globuli rossi derivante dalla formazione di anticorpi anti-EPO in seguito alla somministrazione di rHuEPO (Randolph *et al.*, 2004). Al momento, tuttavia, l'EPO ricombinante canina non è disponibile per il commercio.

Visti i limiti, quindi, la terapia con rHuEPO andrebbe intrapresa solo in pazienti in stadi avanzati di CKD e in cui la correzione dell'anemia ha lo scopo di migliorare la qualità di vita. Il trattamento viene eseguito nell'arco di 2-8 settimane a seconda del valore di ematocrito iniziale e della dose di rHuEPO somministrata, in quanto l'aumento dell'ematocrito è dose-dipendente (Cowgill *et al.*, 1998).

In assenza di altri trattamenti terapeutici validi, o nel caso in cui sia necessario correggere rapidamente l'anemia, è indicato eseguire una trasfusione di sangue. Tuttavia, a causa della difficoltà nel reperire donatori, dei costi, delle possibili reazioni avverse dopo ripetute trasfusioni, del rischio di trasmissione di agenti infettivi, e del fatto che i globuli rossi in soggetti uremici hanno una vita più breve rispetto alla norma, questo tipo di terapia non viene utilizzata comunemente nei pazienti CKD (Polzin, 2011).

4.11 *Follow-up* e monitoraggio

Dopo aver stabilito un protocollo terapeutico, sarebbe adeguato monitorare le condizioni del paziente e le risposte al trattamento ogni 2-4 settimane, fino a che non si evidenzia un'adeguata risposta alla terapia. Successivamente, i pazienti in stadio IRIS 1 e 2 con funzionalità renale stabile, possono essere rivalutati ogni 4-6 mesi, mentre i pazienti in stadio 3 e 4 richiedono dei controlli più frequenti, ogni 2-4 mesi. Le visite possono essere programmate anche più frequentemente valutando la gravità della nefropatia, la presenza di complicazioni, le terapie in atto e la risposta ad esse (Polzin, 2011).

È necessario ricordare che i pazienti con malattia renale cronica possono essere maggiormente a rischio di reazioni avverse ai farmaci e di nefrotossicità, poiché hanno

una diminuita capacità di filtrazione glomerulare, che influisce sull'eliminazione dei farmaci per via renale e sulla loro emivita; inoltre, in questi pazienti, la distribuzione, il legame con le proteine e la metabolizzazione epatica delle molecole somministrate può essere alterata. La scelta dei farmaci e del loro dosaggio dovrebbe quindi essere valutata attentamente, evitando, se possibile, la prescrizione di molecole nefrotossiche o che vengono eliminate per via renale.

PARTE SPERIMENTALE

Capitolo 5

Obiettivi

La malattia renale cronica è una patologia molto frequente nella pratica clinica veterinaria del cane e ancora di più del gatto. Le prevalenze riportate in letteratura sono estremamente variabili, ma possono anche raggiungere il 10% nel cane ed il 30% nel gatto in età geriatrica.

Il presente studio nasce dalla necessità, sempre più sentita nella pratica clinica quotidiana, di poter fornire al proprietario del paziente, in questo caso affetto da malattia renale cronica, una serie di fattori che possano aiutare a comprendere quale sia la prognosi del paziente stesso. Tale richiesta nasce in molti casi dal fatto che spesso la gestione di questi pazienti comporta costi elevati sia in termini economici sia in termini di impegno quotidiano per la somministrazione delle terapie, nonché, purtroppo, in alcuni casi situazioni frustranti dal punto di vista del risultato ottenuto.

L'obiettivo principale di questo studio è stato quello di suggerire, o idealmente identificare, potenziali fattori prognostici per l'*outcome* finale (decesso/eutanasia) in una popolazione di cani con CKD. In particolar modo lo studio è stato finalizzato alla analisi di parametri clinico-patologici di uso relativamente comune, o in taluni casi specialistico, che, se valutati al momento della diagnosi, possano essere associati ad una riduzione significativa della sopravvivenza dei soggetti inclusi.

Per identificare potenziali fattori prognostici, lo studio è partito dalla identificazione di una popolazione di cani affetti da CKD e in un certo numero di essi ne ha seguito il *follow-up*, o ne ha ricostruito il *follow-up* stesso, per tutto il periodo di sopravvivenza fino al momento dell'*exitus*.

Capitolo 6

Materiali e metodi

6.1 Selezione dei pazienti nefropatici cronici

Criteria di inclusione

I cani sono stati definiti come affetti da CKD in base ai risultati di indagine anamnestica, esame clinico, misurazione della pressione arteriosa, diagnostica per immagini, esami ematochimici, analisi delle urine ed eventuale esame istologico renale.

I principali reperti clinici prevedevano segni clinici compatibili con CKD e tipicamente una storia di poliuria/polidipsia, perdita di peso, disoressia, vomito cronico, letargia/astenia, pallore delle mucose, edemi e ipertensione arteriosa. La diagnostica per immagini e in particolare l'ultrasonografia renale doveva evidenziare segni di malattia renale cronica quali diminuzione delle dimensioni, aumento della ecogenità con ridotta distinzione cortico/midollare, alterazioni di forma e superficie, presenza di mineralizzazioni e/o lesioni cistiche disseminate e riduzione della parenchimografia Doppler.

La diagnosi di CKD si è basata poi sui risultati degli esami clinicopatologici e in particolar modo i cani dovevano presentare una concentrazione di creatinina sierica $> 1,40$ mg/dl con peso specifico urinario inadeguato (<1030) e/o presenza di proteinuria patologica persistente (UPC $> 0,5$ con sedimento "non attivo"). Gli animali dovevano presentare tali segni da almeno 3 mesi, essere clinicamente stabili e avere i risultati delle indagini collaterali confermati in misurazioni successive alla prima visita.

I cani CKD presentati per una consulenza nefrologica presso l'Ospedale didattico veterinario sono stati inclusi in modo prospettico e monitorati nel tempo. L'indagine retrospettiva è stata condotta su cartelle nefrologiche e non, nel periodo gennaio 2004 - agosto 2011 utilizzando il software gestionale *Fenice 3.00*.

Criteria di esclusione

Gli animali sono stati esclusi dallo studio in base ai seguenti criteri:

- presenza di cartelle cliniche o *follow-up* incompleti;
- soggetti con diagnosi di danno renale acuto (AKI) o "acuto su cronico";

- soggetti con condizione clinica potenzialmente riferibile a CKD ma clinicamente “instabili” (ad es.: crisi uremiche);
- presenza di gravi patologie concomitanti (ad es.: piometra; pancreatite acuta; neoplasie);
- presenza di concomitanti cardiopatie in stato avanzato trattate con diuretici ad alto dosaggio (ad es.: endocardiosi mitralica);
- assenza di matrici biologiche stoccate o adeguatamente conservate.

6.2 Stadiazione IRIS, altre categorie diagnostiche ed exitus

I pazienti selezionati sono stati suddivisi in 4 gruppi o stadi di malattia renale cronica in base alle linee guida proposte dal gruppo IRIS (www.iris-kidney.com).

Sono stati inoltre suddivisi in “anemici” e “non anemici” assumendo un *cut-off* di valore ematocrito pari a 35%.

I cani sono stati considerati “proteinurici” e “non proteinurici” utilizzando un *cut-off* di UPC pari a 0,5 e “iperfosfatemici” o “normofosfatemici” con un *cut-off* di fosforo sierico di 4,9 mg/dl.

I pazienti sono stati considerati “morti” nel caso in cui sia stato possibile individuare nel sistema gestionale *Fenice 3.00* un'indicazione di decesso o eutanasia riferibile alla CKD. Nei casi in cui la storia clinica fosse stata incompleta o non fosse indicato chiaramente l'exitus, si è proceduto a ricontattare telefonicamente i proprietari di tali soggetti per ottenere le informazioni mancanti.

6.3 Metodica di prelievo e processazione dei campioni

I prelievi di sangue sono stati eseguiti attraverso un sistema a vuoto VACUTEST kima srl[®] e quando possibile sono state raccolte:

- un'aliquota di sangue in K₃-EDTA;
- una o più aliquote di sangue senza anticoagulante, con gel separatore, per ottenere il siero;
- un'aliquota di sangue con Na-citrato.

Il sangue raccolto in K₃-EDTA con provette VACUTEST[®] è stato processato entro un'ora dal prelievo per l'esecuzione dell'**esame emocromocitometrico**. Tale esame è stato ottenuto utilizzando il sistema per ematologia *Automated Hematology System ADVIA[®]*

2120, (Siemens). Prima delle determinazioni analitiche, i campioni in K₃-EDTA sono stati sottoposti ad agitazione tramite Vortex (Reamix 2789).

I parametri valutati sono stati: eritrociti (RBC/mm³), valore ematocrito (Hct%), emoglobina totale (Hgb g%), volume corpuscolare medio (MCV fl), contenuto medio di emoglobina (MCH pg), concentrazione corpuscolare media di emoglobina (MCHC g%), ampiezza della distribuzione eritrocitaria (RDW), leucociti totali (WBC/mm³), piastrine (PLT/mm³), volume piastrinico medio (MPV), conta reticolocitaria assoluta e percentuale, indice di produzione reticolocitaria. Gli strisci di sangue eseguiti a fresco e colorati con *May-GrünWald-Giemsa* (Merk[®]) o *MGG-Quick Stain* (Bio-Optica) sono stati esaminati al microscopio al fine di valutare la morfologia eritrocitaria, la morfologia e la formula differenziale leucocitaria, la stima e la morfologia piastrinica nonché l'eventuale presenza di aggregati.

Il sangue raccolto in provette da siero (VACUTEST[®] con "Gel and clot activator") è stato immediatamente posto in termoblocco (THERMOBLOC, FALC) a 37°C e lasciato per 30 minuti. La separazione del siero è stata ottenuta attraverso centrifugazione per 10 minuti a 3000 × g. Il siero è stato utilizzato per l'esecuzione di un **profilo chimico** comprendente ALT, AST, fosfatasi alcalina, creatinina, urea, fosforo, glucosio, bilirubina totale, acidi biliari, GGT, proteine totali, albumina, rapporto albumina/globuline, calcio, sodio, potassio, cloro. Tutte le determinazioni sono il risultato di metodiche installate sull'analizzatore automatico OLYMPUS AU 400.

Il sangue in Na-citrato raccolto con VACUTEST[®] (provette allestite +con Na-citrato in soluzione 0,11 mol/l, rapporto Na-citrato/sangue di 1 + 9) è stato processato in laboratorio entro 2 ore dal prelievo. La separazione del plasma citrato è stata ottenuta attraverso centrifugazione per 10 minuti a 3000 × g. Il surnatante è stato successivamente prelevato con pipette monouso, evitando lo strato eritrocitario sottostante, al fine di ottenere un campione di plasma povero di piastrine.

L'**analisi delle urine** è stata effettuata su campioni di urina prelevati tramite minzione spontanea, cistocentesi e cateterismo urinario.

Il peso specifico urinario dei campioni di urina è stato misurato tramite un refrattometro, calibrato giornalmente con acqua distillata.

Per valutare il pH, le proteine, il glucosio, i corpi chetonici, la bilirubina, i leucociti e l'emoglobina presenti nei campioni sono stati utilizzati dei *dipstick*. Il *dipstick* è una metodica semiquantitativa utilizzata di routine nella pratica veterinaria e in medicina umana. Le strisce reattive utilizzate sono le *DIRUI*[®], serie H10. Il test prevede la

disposizione di una goccia di campione tramite micropipetta sui tamponi assorbenti della striscia reattiva. In pochi secondi avviene la reazione colorimetrica. Per eliminare gli errori di lettura operatore-dipendenti, per la lettura della variazione colorimetrica è stato utilizzato uno strumento che sfrutta la fotometria a riflessione (DIRUI H500).

L'esame del sedimento è stato effettuato entro 30 minuti dal prelievo, oppure entro 4 ore mantenendo il campione a una temperatura di 4°C. Il sedimento è stato ottenuto centrifugando il campione a 1500xg per 10 minuti. Successivamente è stato rimosso il surnatante e il sedimento è stato valutato al microscopio ottico.

Il sedimento è stato ritenuto "attivo" in base alle seguenti caratteristiche:

- > 1 batteri/HPF;
- > 250 eritrociti/HPF;
- > 5 leucociti/HPF.

Quando necessario è stato eseguito l'esame batteriologico.

Con le matrici di surnatante urinario si è proceduto alla misurazione della creatinina urinaria, delle proteine totali urinarie e dell'albumina urinaria. Sono stati successivamente calcolati i rapporti: proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC) e albumina urinaria/creatinina urinaria (UAC).

Tutte le misurazioni sono state eseguite presso il Laboratorio del Servizio di Patologia Clinica Veterinaria (SEPA VET) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'*Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna.

6.4 Metodiche analitiche

Proteine totali urinarie (uTP)

Le proteine totali urinarie sono state misurate con metodica Olympus/Beckma Coulter (Olympus System Reagent – Urinary/CSF protein, OSR 6170). Tale metodica è di utilizzo in routine da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come “metodo al rosso di pirogallolo”.

Principio del test

Il rosso di pirogallolo si combina con il molibdato per formare un complesso rosso con un'assorbanza massima a 470 nm. Il test è basato sulla variazione nell'assorbimento che si verifica quando il complesso rosso di pirogallolo-molibdato lega gli aminogruppi basici delle molecole proteiche dando origine a un complesso blu-porpora con un'assorbanza

massima a 600 nm. L'assorbanza di questo complesso è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteina nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1	Rosso di pirogallolo 47 µmol/l Molibdato di Na 320 µmol/l Acido succinico 50 mmol/l Benzoato di Na 3,5 mmol/l Ossalato di Na 1,0 mmol/l Metanolo 0,8% w/v	Conservazione: 2-8 °C a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Calibratore	OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR Sieroalbumina umana 0,5 g/l	Conservazione: 2-8 °C fino a 7 gg 15-25 °C a 2 gg
Controllo	Controllo Sentinel diagnostics Dropper Level 1 e 2	Conservazione: 2-8 °C a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni

Tabella 6.1: Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione delle proteine totali urinarie.

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 1 e 200 mg/dl. La concentrazione minima rilevabile è di 0,7 mg/dl.

Interferenze

Interferenze inferiori al 10% per:

Bilirubina 0,3 mmol/l.

Glucosio 277 mmol/l.

Acido urico 18 mmol/l.

Albumina urinaria (uAlb)

L'albumina urinaria è stata misurata con metodica Olympus/Beckman Coulter (Olympus System Reagent – Microalbumin, OSR 6167). Tale metodica di tipo immunoturbidimetrico è di utilizzo in routine da diversi anni in medicina umana e nel nostro laboratorio. Il metodo è stato validato nel cane come riportato in letteratura (Gentilini et al., 2005).

Principio del test

Quando il campione viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, l'albumina reagisce in modo specifico con anticorpi anti albumina umana dando origine ad un composto di aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di albumina nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1 e R2	Soluz. Tampone Tris (pH 7,6) 71 mmol/l Anticorpi di capra anti albumina umana Conservante	Conservazione: 2-8° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni a 2-8 °C
Calibratore	Calibratore allestito presso il nostro laboratorio	
Controllo	Controllo allestito presso il nostro laboratorio	

Tabella 6.2: Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'albumina urinaria.

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 1 e 30 mg/dl e ha una tolleranza al fenomeno prozona di 600 mg/dl.

Interferenze

Glucosio: interferenza < 5% fino a 3000mg/dl di glucosio aggiunto.

Creatinina: interferenza < 5% fino a 300 mg/dl di creatinina aggiunta.

Creatinina sierica e urinaria

La creatinina (sierica e urinaria) è stata misurata con metodica Olympus/Beckman Coulter (Olympus System Reagent – Creatinine, OSR 6178). Tale metodica è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come "metodo di Jaffé".

Principio del test

La Creatinina forma un composto giallo-arancio con acido picrico in un mezzo alcalino. La variazione nell'assorbanza a 520-800 nm è proporzionale alla concentrazione di creatinina nel campione.

Creatinina + acido picrico = complesso di picrato e creatinina.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione della creatinina

Reagente R1 e R2	Idrossido di sodio 120 mmol/l Acido picrico 2,9 mmol/l Conservante	Stabili tra 2 e 8 °C a confezione integra fino a data di scadenza; aperti per 14 gg
Calibratore	Olympus System Calibrator Cat. n° 66300	Stabile tra 2 e 8 °C fino a 7 gg; tra 15 e 25 °C per 2 gg
Controllo	Controlli Olympus Cat. n° ODC0003 e ODC0004	Stabili tra 2 e 8 °C fino a 7 gg; tra 15 e 25 °C per 2 gg

Tabella 6.3: Reagenti, controllo qualità e calibrazione della creatinina.

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni di creatinina comprese tra 0,06 e 25 mg/dl. Il metodo applicato sulle urine è lineare tra 1 e 400 mg/dl. La concentrazione minima rilevabile usando le impostazioni per il siero è di 0,027 mg/dl.

Interferenze

Ittero: interferenze inferiori al 10% fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: interferenze inferiori al 3% fino a 5 g/l di emoglobina aggiunta.

Lipemia: interferenze inferiori al 10% fino a 600 mg/dl di lipidi (Intralipid®) aggiunti.

Proteine: interferenza inferiore al 6% tra 3 e 10 mg/dl di proteine aggiunte.

Rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC)

L'UPC è stato calcolato attraverso la formula seguente:

$$uPT(\text{mg/dl}) / uCrea(\text{mg/dl}) = \text{UPC}$$

Rapporto creatinina urinaria/albumina urinaria (UAC)

L'UAC è stata calcolata attraverso la formula seguente:

$$uAlb(mg/dl) / uCrea(mg/dl) = UAC$$

Proteina C-reattiva (CRP)

La concentrazione della proteina C-reattiva (CRP) è stata valutata mediante una metodica immunoturbidimetrica (Olympus System Reagent C-REACTIVE PROTEIN OSR 6147), in uso in medicina umana e validata nel nostro laboratorio per il cane.

Principio del test

Il campione di siero viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2. La CRP reagisce e forma aggregati insolubili con il siero anti-CRP, l'assorbanza di tali aggregati è proporzionale alla concentrazione di CRP nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1	Soluzione tampone Tris (Idrossimetil) Aminometano (pH 7,5) 80 mmol/l	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Reagente R2	Sodio cloruro 125 mmol/l Polietilenglicole 6000 1,5 % w/v Anticorpo anti-CRP umana di capra Conservante (sodio azide)	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Multicalibratore	Calibratore allestito presso il nostro laboratorio	Stabili tra 2 e 8 °C fino a 7 gg; tra 15 e 25 °C per 2 gg
Controllo	Controlli allestiti presso il nostro laboratorio	

Tabella 6.4: Reagenti, controllo qualità e calibrazione della CRP.

Linearità

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo di 0,01-9 mg/dl.

Interferenze

Bilirubina: nessuna interferenza significativa fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 500 mg/dl portano a una interferenza significativa del 10%.

Lipidi: concentrazioni di lipidi (Intralipid®) aggiunti di 1000 mg/dl portano a una interferenza significativa del 20%.

6.5 Misurazione della pressione arteriosa

La pressione arteriosa è stata misurata con metodica oscillometrica (petMAP®) o Doppler, secondo le indicazioni e utilizzando i valori di riferimento per la specie canina riportati in letteratura (Polzin, 2011; www.iris-kidney.com).

6.6 Diagnostica per immagini

Le valutazioni ecografiche oggetto di valutazione nello studio sono state ottenute presso il servizio di Diagnostica per immagini del DIMEVET nella quasi totalità dei casi. In un numero limitato di pazienti sono stati valutati immagini e referti ecografici presentati dal proprietario al momento della visita nefrologica.

Le alterazioni compatibili con CKD, come riportato in precedenza, dovevano essere presenti a carico di uno o entrambi i reni.

6.7 Analisi statistica

I dati sono stati riportati con statistiche descrittive ed espressi come mediana e *range* o $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$. Le differenze tra i gruppi sono state valutate con statistiche non parametriche (Mann-Whitney U test o Kruskal Wallis ANOVA a una via). Per le variabili categoriche è stato utilizzato il test Chi quadrato.

I soggetti sono stati definiti “morti” in base a quanto riportato in precedenza e il tempo di sopravvivenza è stato considerato quello intercorrente tra il momento della diagnosi di CKD e la morte del soggetto per cause collegate alla CKD. La data dell'ultimo contatto o dell'ultimo dato presente nel gestionale è stato considerato come il momento dell'esclusione dallo studio per i pazienti di cui era stato perso il *follow-up* o per i quali la morte non era chiaramente associata alla CKD o in alcuni casi era imputabile a cause diverse da CKD.

L'analisi di regressione di Cox e l'analisi logistica sono state utilizzate per individuare eventuali fattori significativamente associati alla prognosi del paziente, sia in un modello univariato, che in un modello multivariato (*stepwise*).

Per valutare la differenza nei tempi di sopravvivenza tra gruppi diagnostici è stata utilizzata l'analisi di sopravvivenza di Kaplan-Meier. Per questa analisi sono stati utilizzati dei valori di *cut-off* "arbitrari" che nella maggior parte dei casi corrispondono al limite superiore o inferiore dell'intervallo di riferimento del parametro in esame a seconda che esso sia significativo in incremento o in decremento.

I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per $p < 0,05$.

Per le analisi statistiche e la creazione dei grafici sono stati utilizzati i seguenti software:

- MedCalc Statistical Software versione 14.8.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2014);
- Microsoft Excel 2008 per Mac, versione 12.1.0.

Capitolo 7

Risultati

7.1 Popolazione selezionata e dati epidemiologici

Lo studio in oggetto ha riguardato 321 soggetti affetti da CKD a diverso stadio che rispondevano ai criteri di inclusione.

La popolazione si presentava eterogenea per età, sesso e razza. L'età mediana era di 10 anni e 4 mesi (range: 6 mesi - 17 anni e 3 mesi). Le età dei pazienti CKD sono raffigurate nella Figura 7.1.

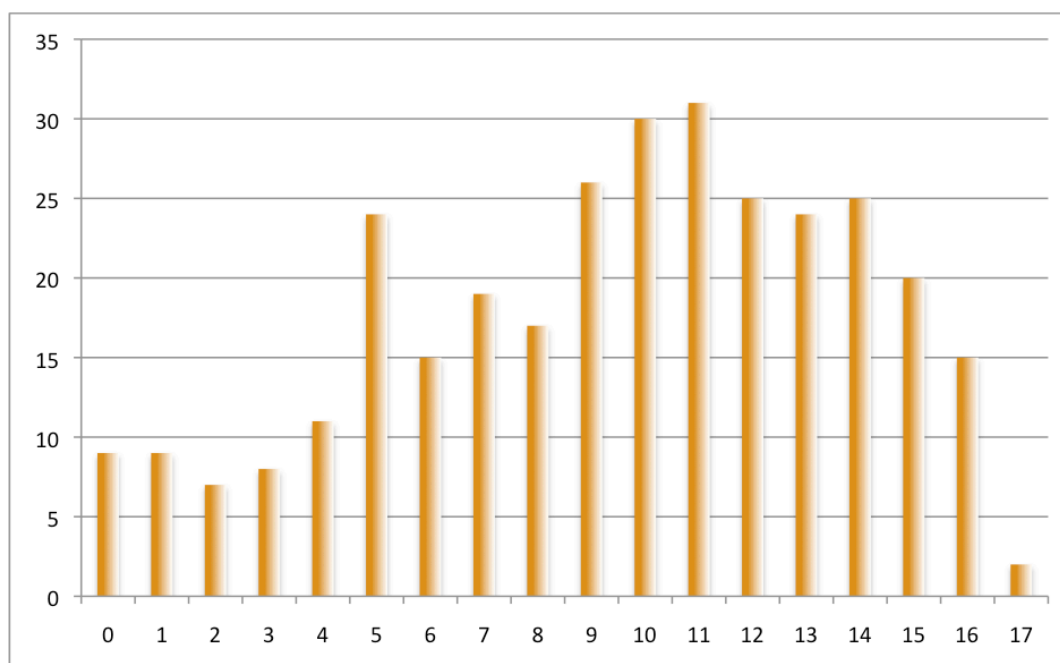


Figura 7.1: Grafico della distribuzione dell'età dei pazienti selezionati.

La popolazione era suddivisa in 58% di maschi e 42% di femmine. I cani selezionati sono prevalentemente di sesso maschile ed interi ($n=170$). La distribuzione del sesso nei pazienti CKD è riportata nella Figura 7.2.

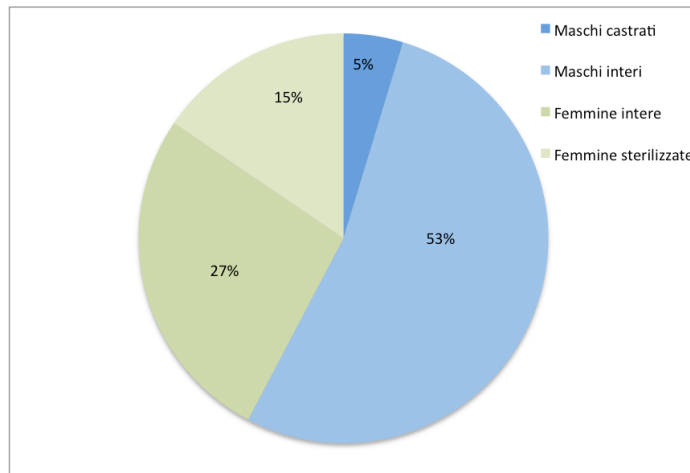


Figura 7.2: Distribuzione del sesso.

Il 31% dei cani erano meticci. Le razze più rappresentate erano Boxer, Labrador, Rottweiler, Setter Inglese, Dalmata, Pastore Tedesco e Yorkshire Terrier con una frequenza tra il 3% e il 5%; nessuna razza è risultata sovrarappresentata. Tutte le razze con una frequenza inferiore al 3% sono state incluse nella categoria “altre razze” che quindi rappresentava il 37,5% della popolazione totale.

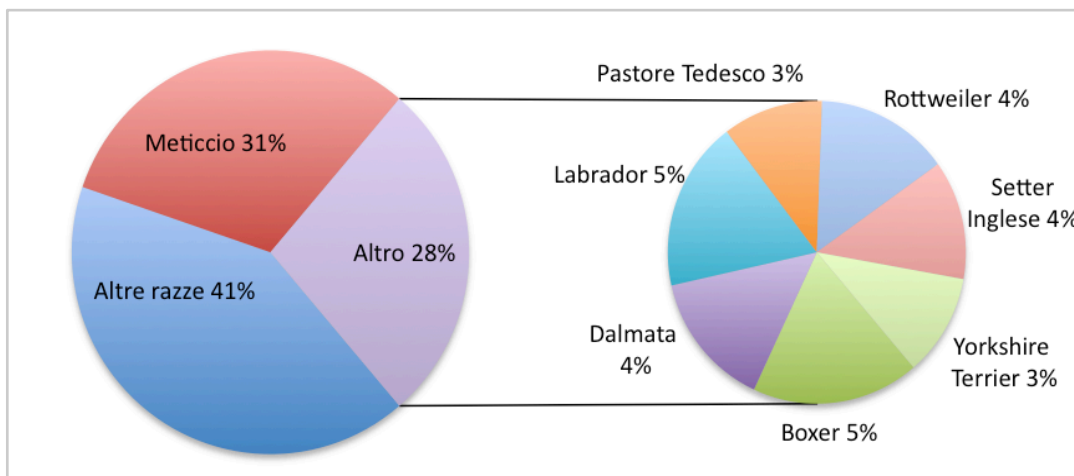


Figura 7.3: Distribuzione delle razze.

Gruppo “morti”

I pazienti inclusi in questo gruppo erano 119/321. L'età mediana era 11 anni e 4 mesi (*range* 6 mesi-17 anni e 3 mesi). Le età dei pazienti del gruppo “morti” sono rappresentate nella Figura 7.4.

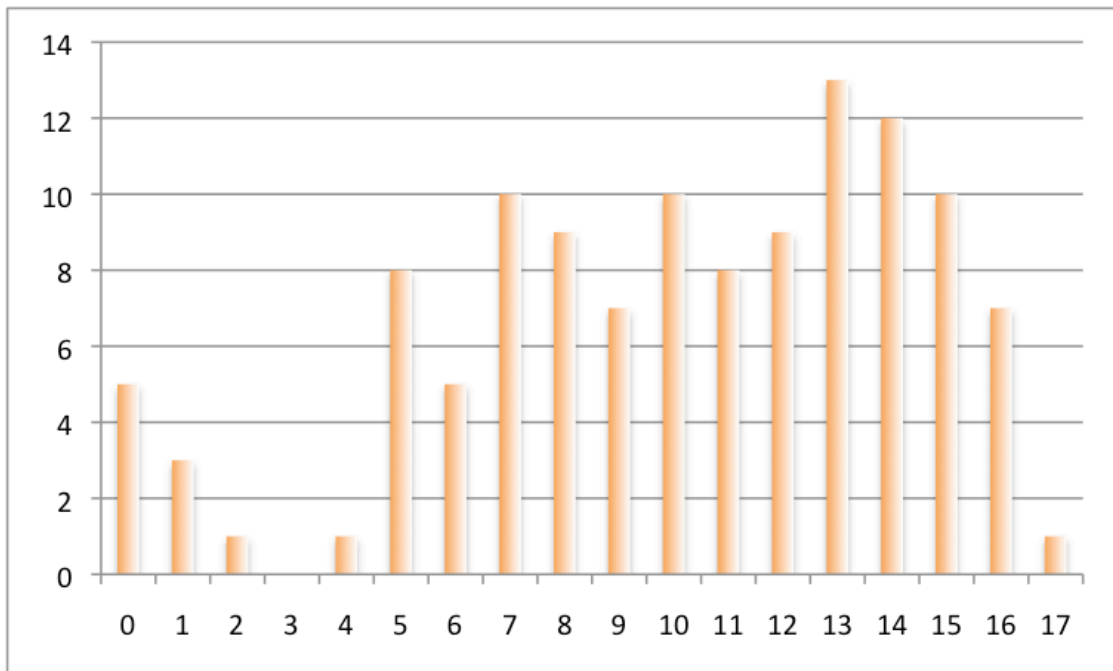


Figura 7.4: Distribuzione dell'età dei pazienti del gruppo "morti".

La popolazione del gruppo "morti" era suddivisa in 62% di maschi e 38% di femmine, con una prevalenza maggiore dei maschi interi.

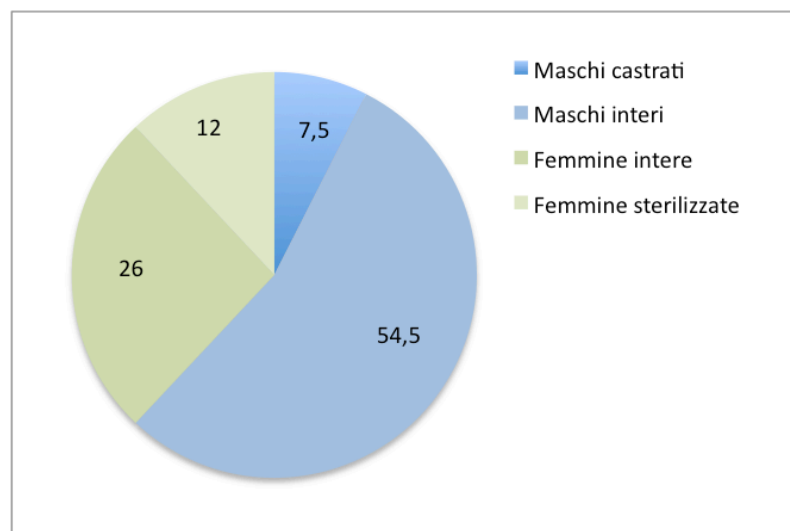


Figura 7.5: Distribuzione del sesso nei pazienti del gruppo "morti".

La distribuzione delle razze in questo gruppo è risultata sovrapponibile a quella della popolazione CKD analizzata.

7.2 Risultati delle indagini clinicopatologiche nella popolazione CKD

La concentrazione di creatinina sierica era disponibile per 321/321 soggetti. Le altre variabili oggetto di valutazione non sono sempre state disponibili, ma la mancanza di dati non ha mai superato il 30%. I dati disponibili sono riassunti nella seguente tabella (Tabella 7.1).

Tabella 7.8: Variabili oggetto di studio e numero di dati disponibili per ciascuna.

Parametro	Numero di casi sul totale (n=321)	Parametro	Numero di casi sul totale (n=321)
Creatinina	321	Peso specifico urinario	287
Urea	320	uTP disptick	274
Fosforo	304	UPC	237
ALT	320	UAC	217
Proteine totali	320	Sedimento urinario	269
Albumina	319	Hct	318
Albumina/Globuline	319	Hgb	318
CRP	289	MCV	318
Ferro totale	301	MCHC	318
TIBC	301	Piastrine	317
Sat%	301	Reticolociti totali	317
Ferritina	284	Leucociti totali	318

Risultati relativi alla CKD e alla stadiazione IRIS

I pazienti CKD presentavano valori mediani di creatinina di 2,77 mg/dl (*range* 0,65-22,07 mg/dl). Il peso specifico urinario mediano era di 1014 (*range* 1000-1060), l'UPC mediano era di 1,5 (*range* 1-27,4). Nella Tabella 7.2 sono riassunti i dati disponibili per la valutazione della patologia renale e la loro distribuzione.

In base ai *cut-off* di fosforo sierico e di UPC, 175/304 (58%) dei soggetti sono risultati "iperfosfatemici" e 175/237 (74%) sono risultati "proteinurici".

Tabella 7.9: Parametri riferibili a CKD e relativi valori.

Parametro	Media	Mediana	Range	Intervallo di riferimento
Creatinina (mg/dl)	4,07	2,77	0,65-22,07	0,65-1,35
Urea (mg/dl)	192	138	18-815	18-55
Fosforo (mg/dl)	8,1	5,4	1,6-36,7	2,6-4,9
Peso specifico urinario	1016	1014	1000-1060	>1030
UPC	3,12	1,5	0,1-27,4	<0,4
UAC	1,607	0,388	0,001-14,647	<0,024

I risultati della stadiazione IRIS in base ai valori di creatinina sono riportati nella Tabella 7.3 e nella Figura 7.4. Il 65% dei soggetti è risultato appartenere allo stadio 3 e 4.

Tabella 7.10: Distribuzione della popolazione secondo stadiazione IRIS.

Stadio IRIS	Creatinina sierica (mg/dl)	Numero di casi
Stadio 1	<1,4	36/321 (11%)
Stadio 2	1,4-2,0	78/321 (24%)
Stadio 3	2,1-5,0	118/321 (37%)
Stadio 4	>5,0	89/321 (28%)

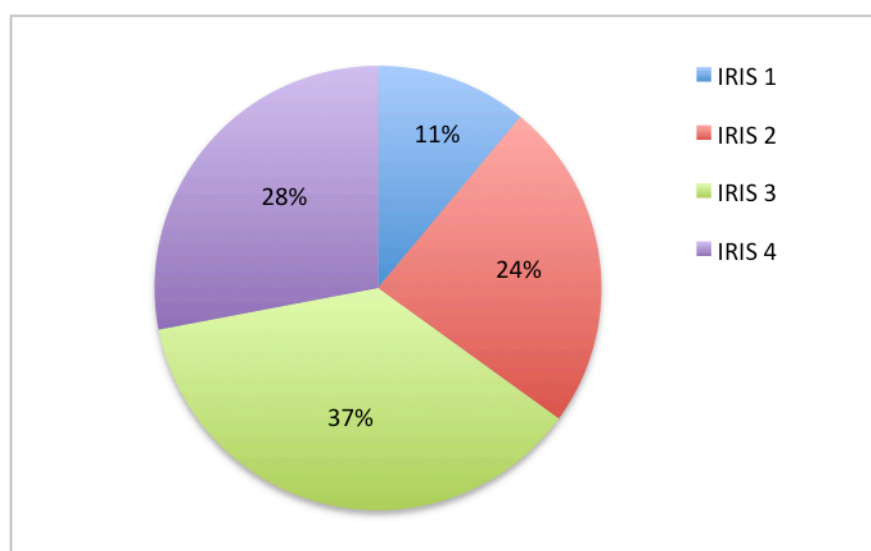


Figura 7.4: Frequenza dei diversi stadi IRIS nella popolazione selezionata.

Risultati relativi ai dati ematologici

L'esame emocromocitometrico era disponibile per 318/321 soggetti. Il valore ematocrito mediano era 36% (range 5-57,5%). I risultati sono riassunti nella Tabella 7.4.

Tabella 7.11: Parametri ematologici e rispettivi valori.

Parametro	Media	Mediana	Range	Intervallo di riferimento
Hct (%)	36	36,5	5-57,5	37,00-55,0
Hgb (g%)	12,8	13	2-20	12-18
MCV (fl)	67,6	67,8	50,5-81	60,0-77,0
MCHC (g%)	35,5	35,7	29,8-58,8	32,0-38,0
Piastrine (Plt/mm ³)	351000	335000	4810-1063000	160000-500000
Leucociti totali (WBC/mm ³)	12480	10300	4000-62600	6000-17000
Reticolociti totali (Ret/mm ³)	13780	0	0-362000	0-60000

Risultati relativi al profilo chimico

I risultati sono riassunti nella Tabella 7.5.

Tabella 7.12: Parametri analizzati del profilo biochimico e rispettivi valori.

Parametro	Media	Mediana	Range	Intervallo di riferimento
Urea (mg/dl)	191	138	18-815	18-55
Albumina (g/dl)	2,66	2,73	0,85-4,09	2,80-3,70
Proteine totali (g/dl)	6,47	6,48	3,28-12,98	5,60-7,90
Albumine/globuline	0,74	0,74	0,11-1,39	0,60-1,30
ALT (U/L)	90	47	3-1861	20-55
CRP (mg/dl)	2,78	1,41	0,01-27,93	0,01-0,5
Ferro totale (µg/dl)	122	114	14-382	72-285
Ferritina (ng/dl)	182	111,5	7-3152	41-137
Sat% (%)	38	36	6-100	26-75
TIBC (µg/dl)	329	330	101-709	281-452

Risultati relativi all'analisi delle urine

Oltre alla valutazione del peso specifico urinario, dell'UPC e dell'UAC, sono anche state misurate le proteine totali urinarie tramite *dipstick* urinario e la mediana è risultata di 30 mg/dl.

È stato inoltre effettuato un esame del sedimento urinario, classificato come attivo nel 52% dei soggetti e non attivo nel 48% (Figura 7.5). Il sedimento urinario è stato poi associato allo stadio IRIS di ciascun paziente, ma non è risultato essere statisticamente significativo (Figura 7.6).

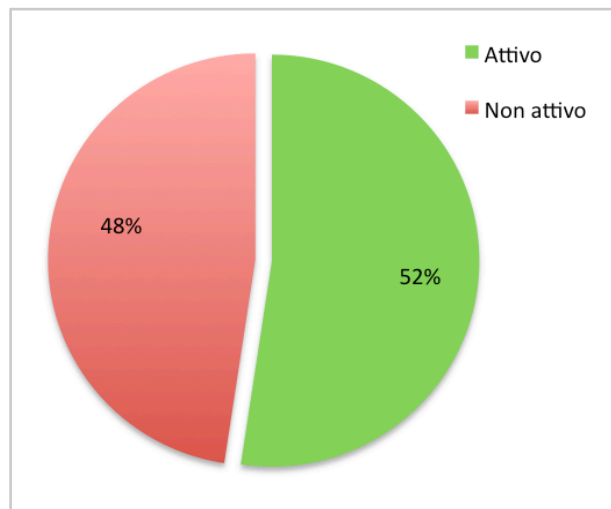


Figura 7.5: Distribuzione dei risultati del sedimento urinario classificato come attivo (> 1 batteri/HPF; > 250 eritrociti/HPF; > 5 leucociti/HPF) e non attivo.

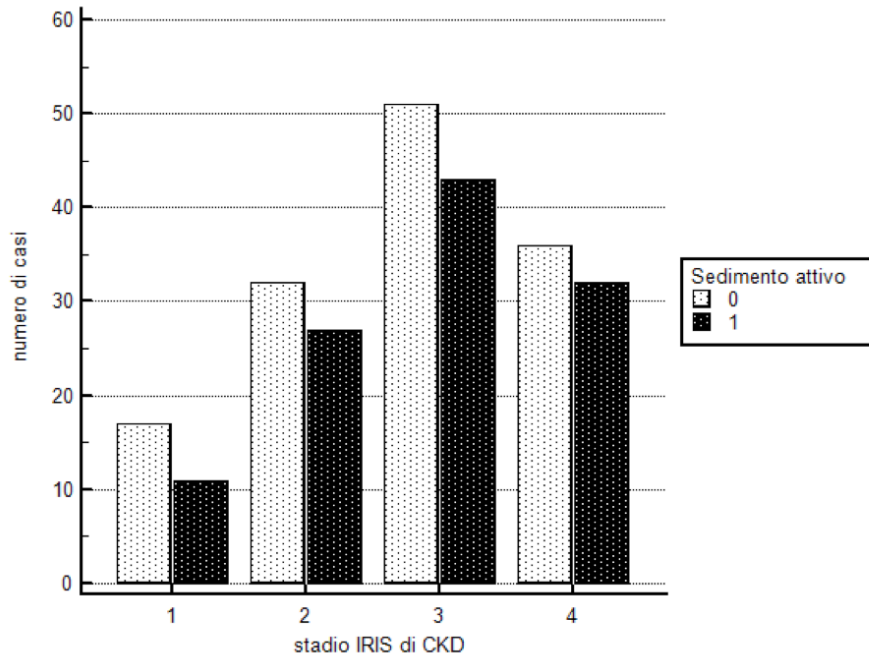


Figura 7.6: Rappresentazione grafica dell'associazione tra sedimento urinario (0= sedimento non attivo; 1= sedimento attivo) e stadio IRIS di CKD.

Risultati relativi alla misurazione della pressione arteriosa

La pressione arteriosa sistolica è stata misurata in 94/321 soggetti. I risultati ottenuti sono riepilogati nella tabella 7.6.

Tabella 7.13: Risultati relativi alla misurazione della pressione arteriosa

Parametro	Media	Mediana	Range	Intervallo di riferimento
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	163	165	70-240	120-150

7.3 Risultati delle indagini clinicopatologiche nel gruppo “morti”

I valori di creatinina sierica erano disponibili per 119/119 soggetti. Le restanti variabili e il numero di dati disponibili sono riassunti nella Tabella 7.7.

Tabella 7.14: Variabili oggetto di studio e numero di dati disponibili per ciascuna.

Parametro	Numero di casi sul totale (n=119)	Parametro	Numero di casi sul totale (n=119)
Creatinina	119	Peso specifico urinario	107
Urea	118	uTP disptick	105
Fosforo	113	UPC	91
ALT	117	UAC	84
Proteine totali	117	Sedimento urinario	103
Albumina	117	Hct	118
Albumina/Globuline	116	Hgb	119
CRP	110	MCV	118
Ferro totale	111	MCHC	118
TIBC	111	Piastrine	118
Sat%	111	Reticolociti totali	118
Ferritina	107	Leucociti totali	118

Risultati relativi alla CKD e alla stadiazione IRIS

Il valore mediano di creatinina sierica nel gruppo “morti” era 3,59 mg/dl (range 0,7-17,6).

I restanti parametri relativi alla patologia renale sono riassunti nella tabella 7.8.

Tabella 7.15: Parametri e rispettivi valori relativi alla patologia renale.

Parametro	Media	Mediana	Range	Intervallo di riferimento
Creatinina (mg/dl)	4,65	3,59	0,71-17,64	0,65-1,35
Urea (mg/dl)	235	174	29-723	18-55
Fosforo (mg/dl)	9,6	6,9	2,5-36,7	2,6-4,9
Peso specifico urinario	1015	1014	1000-1044	>1030
UPC	3,11	1,6	0,1-27,4	<0,4
UAC	1,495	0,362	0,002-13,463	<0,024

I risultati della stadiazione IRIS in base ai valori di creatinina sono riportati nella Figura 7.7. Il 70% dei soggetti è risultato appartenere allo stadio 3 e 4.

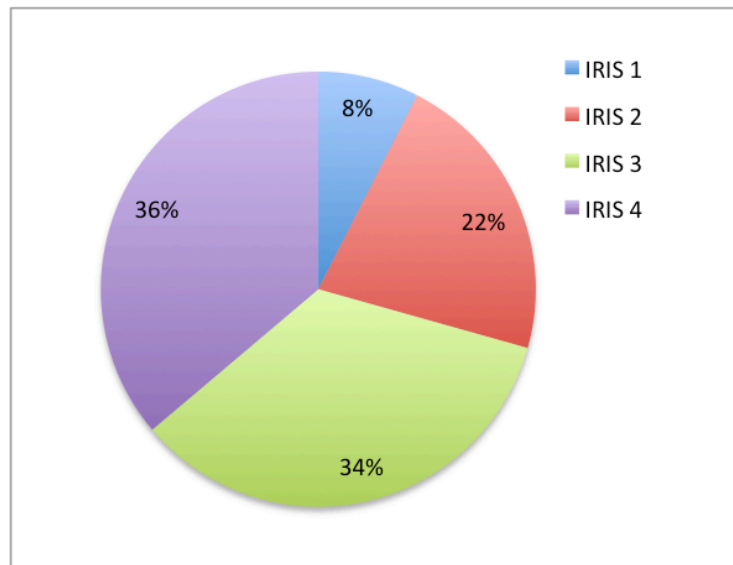


Figura 7.7: Frequenza dei diversi stadi IRIS nella popolazione del gruppo "morti".

Risultati relativi ai dati ematologici

L'esame emocromocitometrico era disponibile per 118/119 soggetti. Il valore ematocrito mediano era 35,4% (range 5-55%). I risultati sono riassunti nella Tabella 7.9.

Tabella 7.16: Parametri ematologici e rispettivi valori.

Parametro	Media	Mediana	Range	Intervallo di riferimento
Hct (%)	34,5	35,4	5-55	37,00-55,0
Hgb (g%)	12,2	12,4	1,5-19,4	12-18
MCV (fl)	67,8	67,6	57,9-81	60,0-77,0
MCHC (g%)	35,5	35,6	30,2-58,8	32,0-38,0
Piastrine (Plt/mm ³)	363000	361500	4810-853000	160000-500000
Leucociti totali (WBC/mm ³)	14400	10900	5000-47200	6000-17000
Reticolociti totali (Ret/mm ³)	9400	0	0-96700	0-60000

Risultati relativi al profilo chimico

I risultati sono riassunti nella Tabella 7.10.

Tabella 7.17: Parametri analizzati del profilo biochimico e rispettivi valori.

Parametro	Media	Mediana	Range	Intervallo di riferimento
Urea (mg/dl)	235	174	29-723	18-55
Albumina (g/dl)	2,62	2,71	0,96-4,09	2,80-3,70
Proteine totali (g/dl)	6,36	6,34	3,28-10,27	5,60-7,90
Albumine/globuline	0,73	0,74	0,18-1,35	0,60-1,30
ALT (U/L)	132	54	14-1861	20-55
CRP (mg/dl)	3,50	2,48	0,01-27,93	0,01-0,5
Ferro totale (µg/dl)	230	117	17-382	72-285
Ferritina (ng/dl)	182	111,5	20-3152	41-137
Sat% (%)	39	34	6-100	26-75
TIBC (µg/dl)	320	325	128-627	281-452

Risultati relativi all'analisi delle urine

Il valore mediano di proteine totali al *disptick* urinario è risultato essere di 30 mg/dl. L'esame del sedimento ha riscontrato nel 54% dei soggetti un sedimento attivo, nel 46% un sedimento non attivo (figura 7.8).

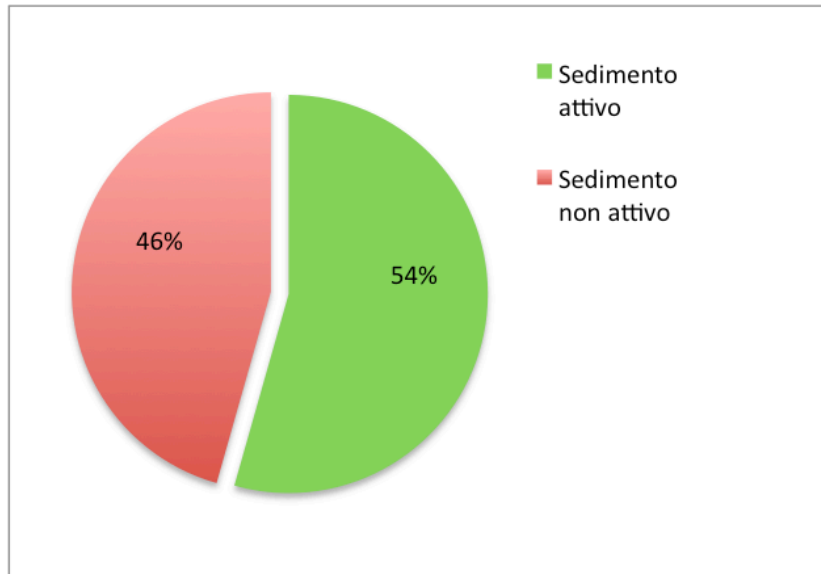


Figura 7.8: Distribuzione dei risultati del sedimento urinario classificato come attivo (> 1 batteri/HPF; > 250 eritrociti/HPF; > 5 leucociti/HPF) e non attivo nel gruppo “morti”.

7.4 Risultati relativi alla valutazione dei segni clinici

Al fine di indagare i segni clinici prevalenti in corso di CKD, è stata valutata la presenza della seguente sintomatologia:

- poliuria/polidipsia (PU/PD);
- perdita di peso;
- anoressia;
- vomito;
- alito urinoso/alitosi;
- pallore mucosale.

Il segno clinico più frequente è risultato essere l'anoressia, presente nel 37% dei pazienti; il meno frequente la presenza di alito urinoso, riscontrato nel 2,5% dei pazienti. I risultati sono illustrati nella Figura 7.9.

Successivamente i segni clinici sono stati associati allo stadio IRIS di ciascun paziente (Figure da 7.10 a 7.15).

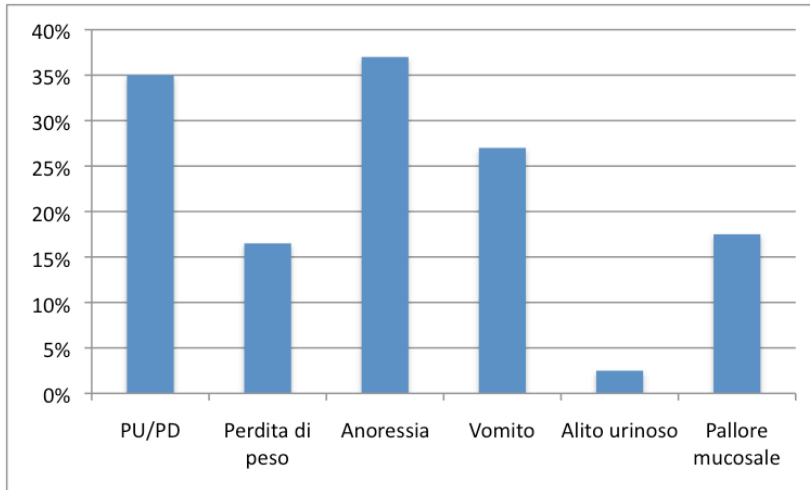


Figura 7.9: Prevalenza dei segni clinici nei pazienti CKD.

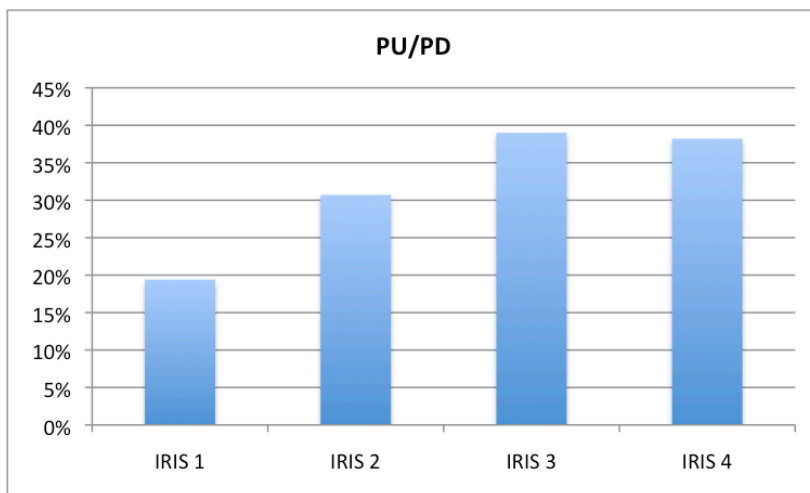


Figura 7.10: Prevalenza del sintomo “PU/PD” nei diversi stadi IRIS. La prevalenza del sintomo nei diversi stadi è risultata statisticamente differente ($p < 0,0001$).

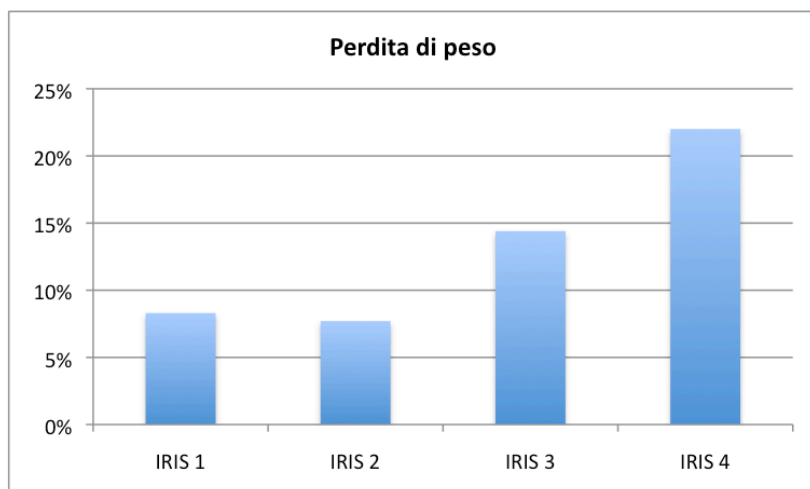


Figura 7.11: Prevalenza del sintomo “perdita di peso” nei diversi stadi IRIS. La prevalenza del sintomo nei diversi stadi è risultata statisticamente differente ($p < 0,0001$).

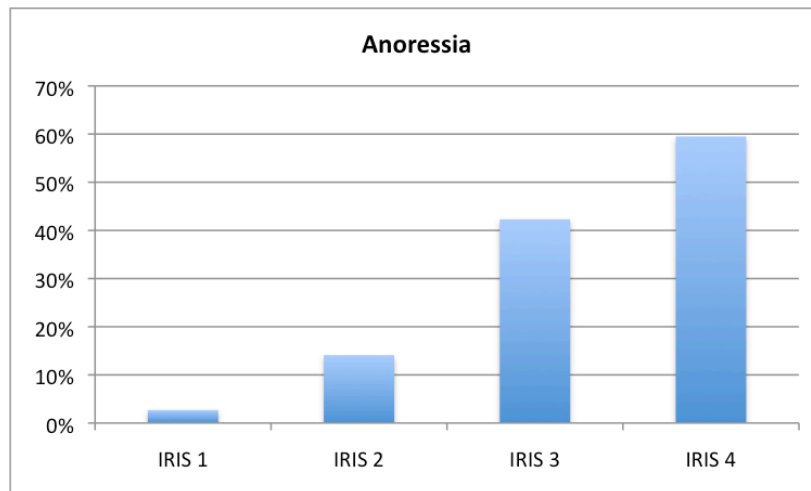


Figura 7.12: Prevalenza del sintomo “anoressia” nei diversi stadi IRIS. La prevalenza del sintomo nei diversi stadi è risultata statisticamente differente ($p < 0,0001$).

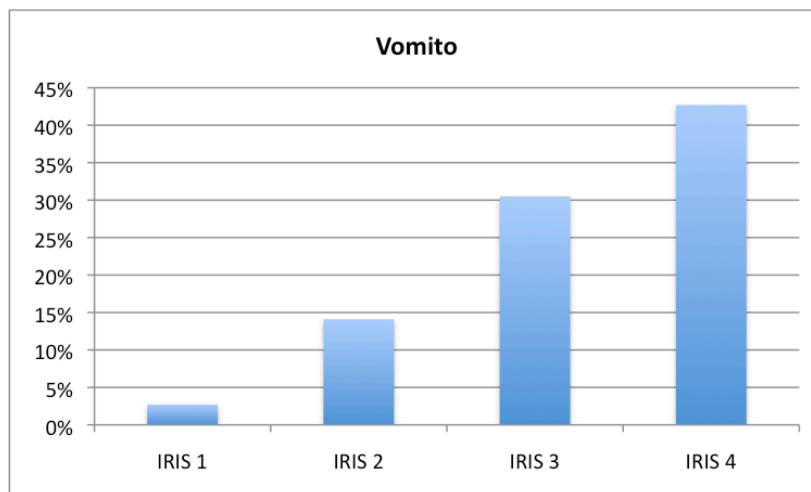


Figura 7.13: Prevalenza del sintomo “vomito” nei diversi stadi IRIS. La prevalenza del sintomo nei diversi stadi è risultata statisticamente differente ($p < 0,0001$).

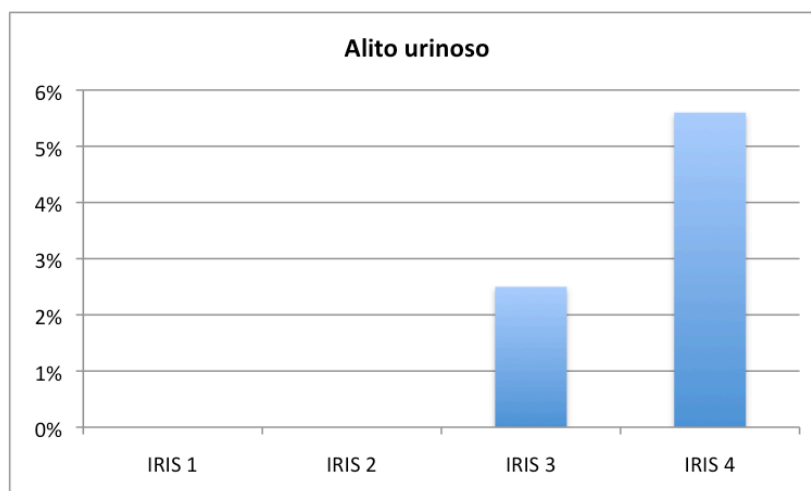


Figura 7.14: Prevalenza del sintomo “alito urinoso” nei diversi stadi IRIS. La prevalenza del sintomo nei diversi stadi non è risultata statisticamente differente.

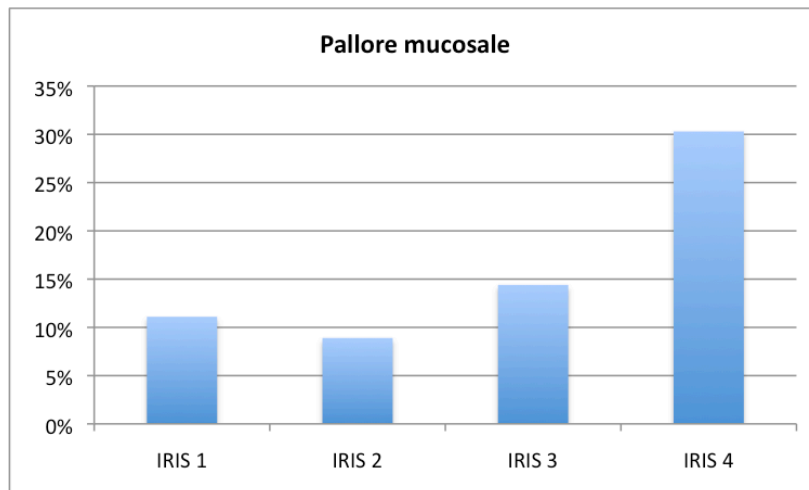


Figura 7.15: Prevalenza del sintomo “pallore mucosale” nei diversi stadi IRIS. La prevalenza del sintomo nei diversi stadi è risultata statisticamente differente ($p < 0,0001$).

7.5 Risultati delle indagini di diagnostica per immagini

Nello studio sono state valutate le seguenti alterazioni ecografiche renali, riferibili o associate a CKD:

- riduzione delle dimensioni;
- alterazioni nella forma e/o nel profilo dell'organo;
- iperecogenicità del parenchima corticale;
- riduzione del confine cortico-midollare;
- riduzione della parenchimografia;
- presenza di pielectasia;
- presenza di mineralizzazioni;
- presenza di una o più cisti.

È stato possibile ottenere dati relativi all'esame ecografico in 171/321 soggetti: di questi, il 14% aveva dei reni definiti ecograficamente nella norma. I risultati ottenuti sono illustrati nella Figura 7.16 e nella Tabella 7.10.

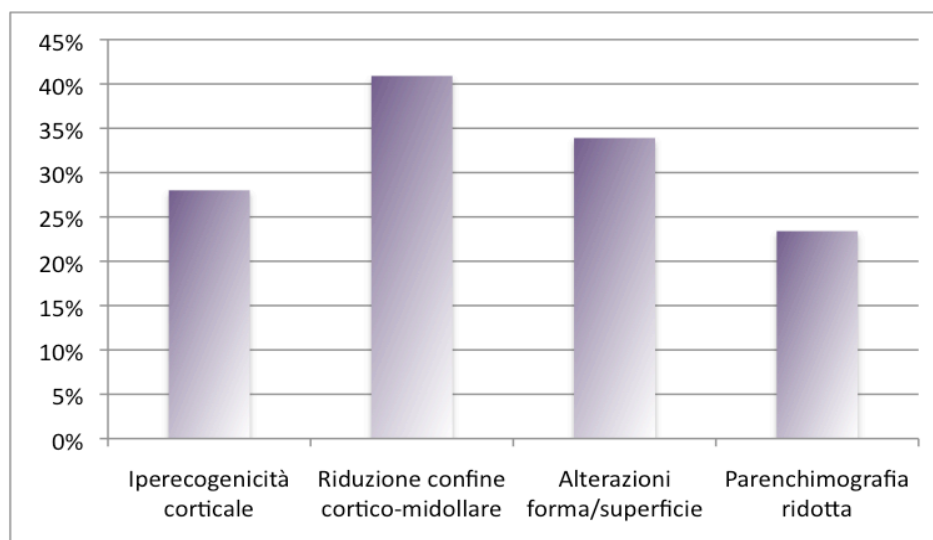


Figura 7.16: Prevalenza delle principali alterazioni ecografiche renali.

Tabella 7.18: Riepilogo della prevalenza delle alterazioni ecografiche renali

Alterazione	Frequenza %
Riduzione del confine cortico-midollare	40,9
Alterazioni nella forma e/o nel profilo dell'organo	33,9
Iperecogenicità del parenchima corticale	28
Riduzione della parenchimografia	23,4
Presenza di una o più cisti	18,7
Presenza di pielectasia	17,5
Presenza di mineralizzazioni	15,2
Riduzione delle dimensioni	15,2

7.6 Fattori prognostici e analisi della sopravvivenza

In base ai dati relativi al *follow-up* è stato possibile includere nella categoria “morti” 119/321 soggetti. Per questo gruppo di pazienti la sopravvivenza mediana dal momento della diagnosi è risultata essere di 38 giorni, quella media di 197 giorni (*range* 1-1646 giorni).

Analisi statistica univariata

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi statistica univariata per l'individuazione di potenziali fattori significativamente associati alla prognosi (Tabella 7.11).

Tabella 7.19: Parametri statisticamente associati alla prognosi dei pazienti con CKD all'analisi univariata.

Parametro	Hazard ratio	I.C. (95%) ¹	P
Albumina/globuline	0,1372	0,0501 - 0,3753	0,0001
Albumina	0,5594	0,4118 - 0,7600	0,0002
Creatinina	1,1934	1,1289 - 1,2615	<0,0001
CRP	1,1137	1,0674 - 1,1619	<0,0001
Ferritina	1,0007	1,0003 - 1,0011	0,0017
Hct	0,9618	0,9413 - 0,9826	0,0004
Hgb	0,8962	0,8435 - 0,9522	0,0004
Fosforo	1,1454	1,1071 - 1,1851	<0,0001
Pressione arteriosa	1,0119	1,0012-1,0228	0,0289
TIBC	0,9961	0,9940 - 0,9982	0,0003
UPC	1,0484	1,0055 - 1,0932	0,0275
Urea	1,0056	1,0042 - 1,0070	<0,0001
Pressione arteriosa	1,0119	1,0012-1,0228	0,0289

Analisi statistica multivariata

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi statistica multivariata per l'individuazione di potenziali fattori significativamente associati alla prognosi (Tabella 7.12).

Tabella 7.20: Parametri statisticamente associati alla prognosi dei pazienti con CKD all'analisi multivariata.

Parametro	Hazard ratio	I.C. (95%)	P
Ferritina	1,0009	1,0004 - 1,0015	0,0015
Fosforo	1,1839	1,1276 - 1,2430	<0,0001

Analisi Kaplan-Meier

L'analisi Kaplan-Meier ha permesso di individuare alcuni fattori prognostici significativi per la sopravvivenza dei pazienti. La sopravvivenza è risultata essere diminuita in modo significativo per i pazienti con: rapporto albumine/globuline <0,6; albumina <2g/dl;

¹ I.C.: intervallo di confidenza

creatinina ≥ 2 e $\geq 3,5$ mg/dl; CRP ≥ 1 mg/dl; ematocrito $< 35\%$; fosforo $\geq 4,5$ mg/dl; TIBC ≥ 280 $\mu\text{g/dl}$; UPC $\geq 0,5$ e ≥ 1 ; urea ≥ 150 mg/dl. Le figure da 7.17 a 7.28 rappresentano graficamente i risultati dell'analisi.

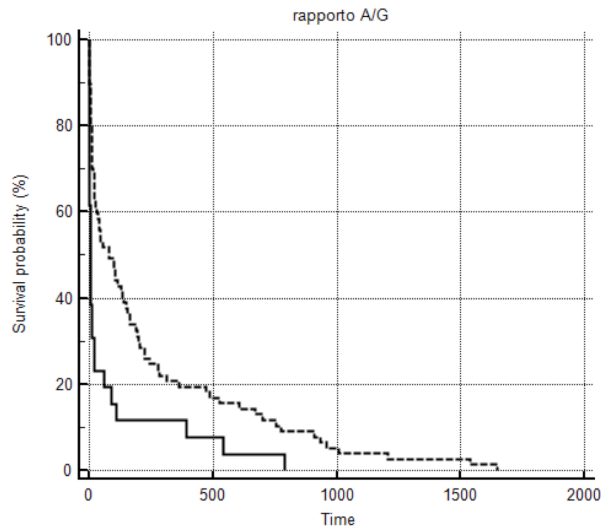


Figura 7.17: Curva Kaplan-Meier del rapporto albumine/globuline utilizzando un valore di 0,6 come *cut-off* ($p=0,0007$).

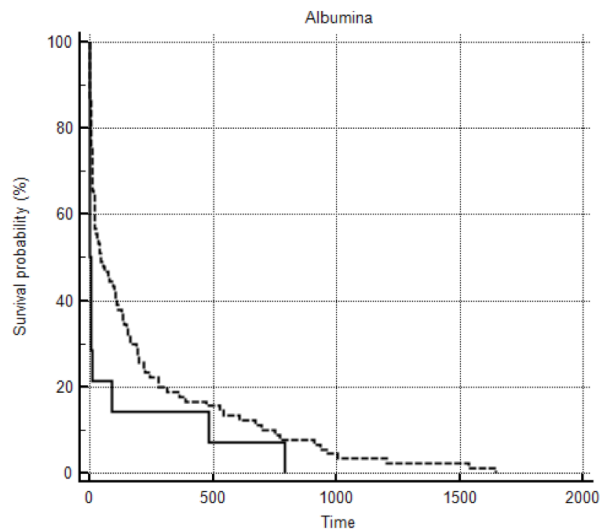


Figura 7.18: Curva Kaplan-Meier dell'albumina utilizzando un valore di 2 g/dl come *cut-off* ($p=0,0203$).

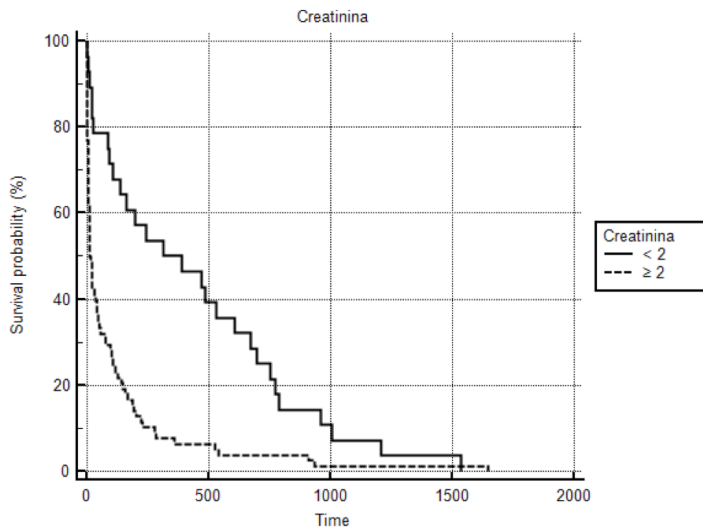


Figura 7.19: Curva Kaplan-Meier della creatinina utilizzando un valore di 2 mg/dl come *cut-off* ($p < 0,0001$).

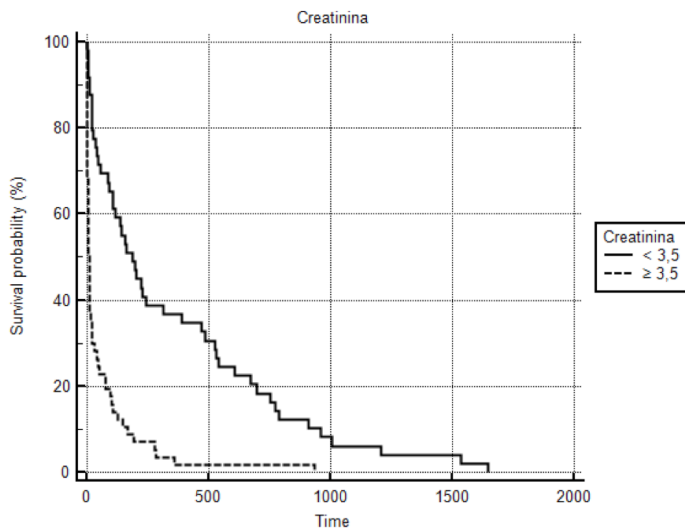


Figura 7.20: Curva Kaplan-Meier della creatinina utilizzando un valore di 3,5 mg/dl come *cut-off* ($p < 0,0001$).

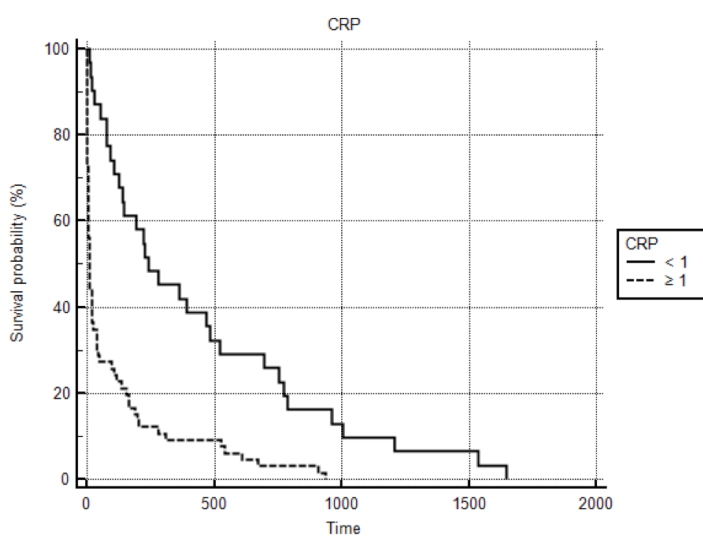


Figura 7.21: Curva Kaplan-Meier della CRP utilizzando un valore di 1 mg/dl come *cut-off* ($p < 0,0001$).

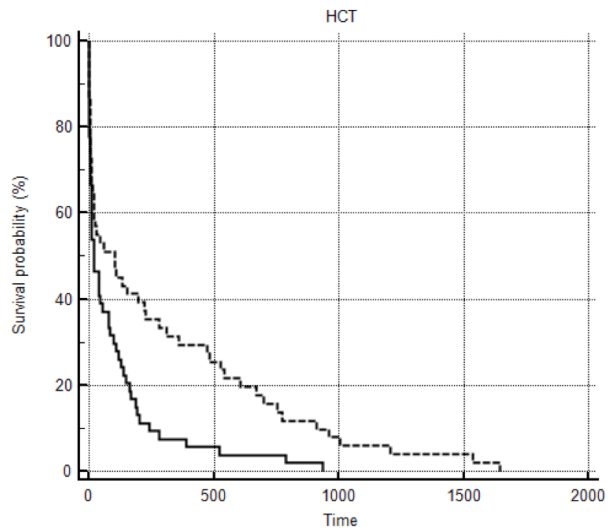


Figura 7.22: Curva Kaplan-Meier dell'ematocrito utilizzando un valore di 35% come *cut-off* ($p=0,0022$).

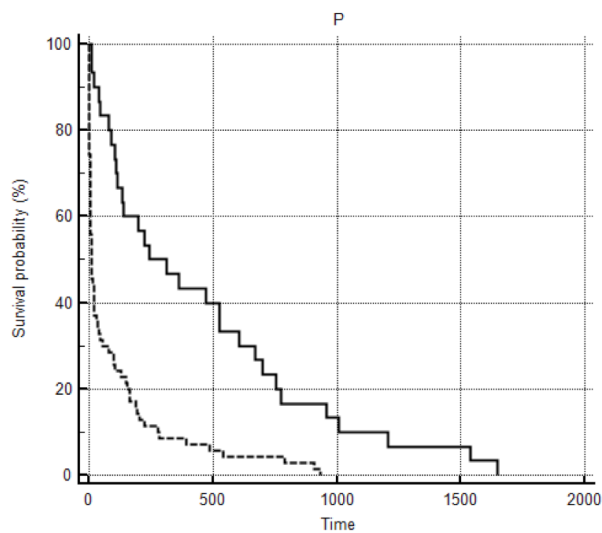


Figura 7.23: Curva Kaplan-Meier del fosforo utilizzando un valore di 4,5 mg/dl come *cut-off* ($p<0,0001$).

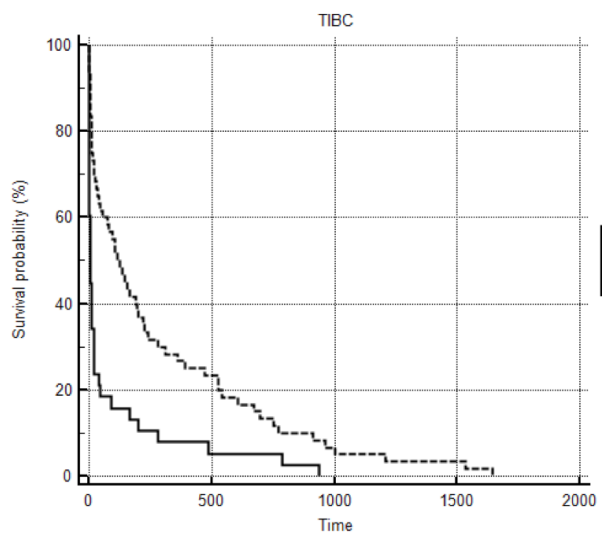


Figura 7.24: Curva Kaplan-Meier della TIBC utilizzando un valore di 280 $\mu\text{g/dl}$ come *cut-off* ($p<0,0001$).

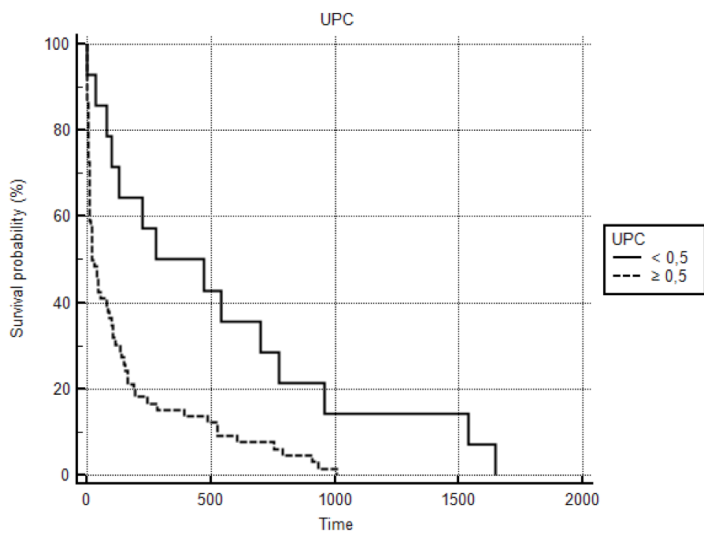


Figura 7.25: Curva Kaplan-Meier dell'UPC utilizzando un valore di 0,5 come *cut-off* ($p=0,0019$).

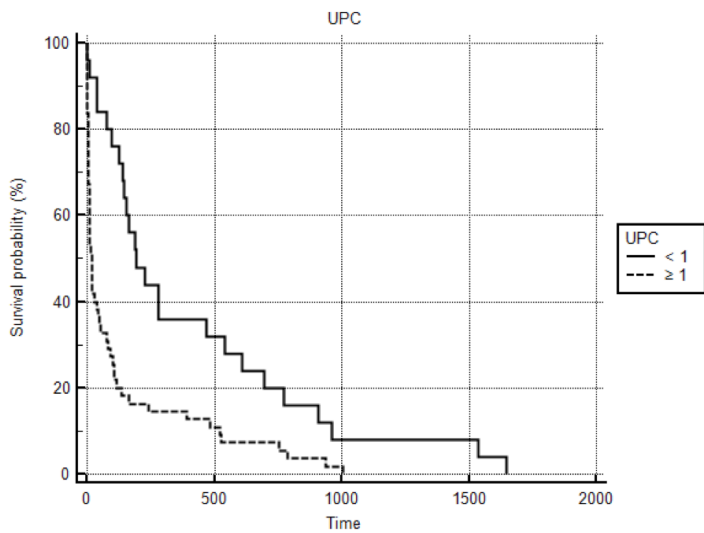


Figura 7.26: Curva Kaplan-Meier dell'UPC utilizzando un valore di 1 come *cut-off* ($p=0,0003$).

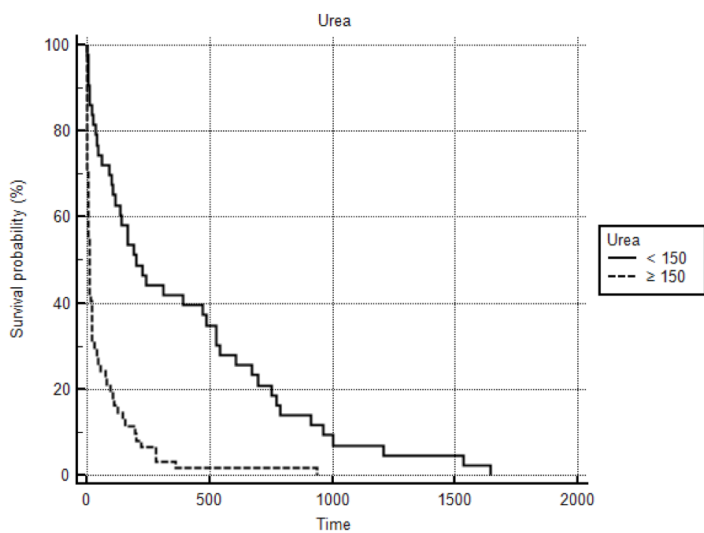


Figura 7.27: Curva Kaplan-Meier dell'urea utilizzando un valore di 150 mg/dl come *cut-off* ($p=<0,0001$).

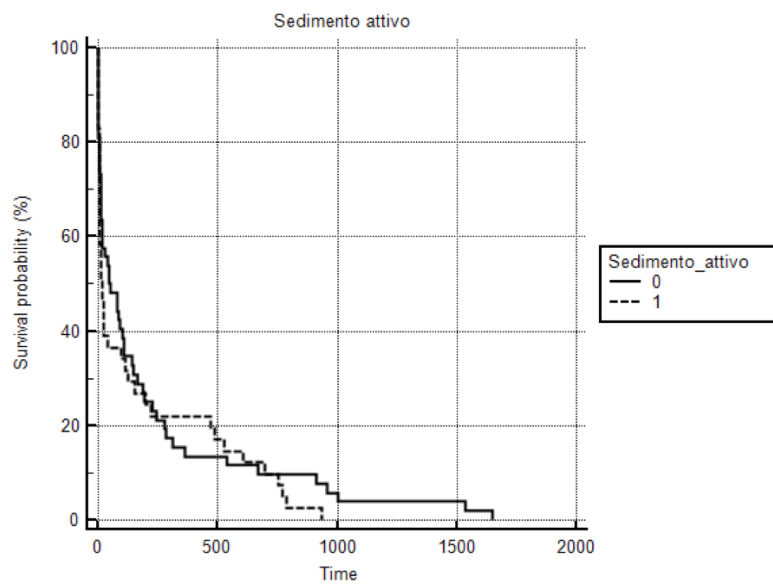


Figura 7.28: Curva Kaplan-Meier del sedimento urinario attivo. Il risultato non è statisticamente significativo.

Capitolo 8

Discussione

Lo studio presentato in questa tesi di laurea aveva come obiettivo principale l'identificazione di fattori prognostici per l'*outcome* finale (decesso o eutanasia) in una popolazione di cani affetti da CKD. Per ottenere tale valutazione si è proceduto alla selezione di una popolazione di cani affetti da malattia renale cronica a partire dai soggetti visitati e/o ricoverati presso l'Ospedale Didattico Veterinario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'*Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna.

La selezione ha consentito una stima della prevalenza della CKD nella nostra realtà universitaria, evidenziando un valore del 4,8% circa nel periodo oggetto di studio; tale valore appare superiore a quanto riportato in letteratura, la quale indica una prevalenza di CKD nella popolazione canina generale tra lo 0,5% e l'1,5% (Brown, 2007). Questa discrepanza potrebbe essere dovuta realmente ad una maggiore frequenza di malattia renale cronica nella nostra realtà veterinaria, o potrebbe essere altresì legata al fatto che il nostro Ospedale rappresenta una struttura di 2° livello presso la quale numerosi colleghi liberi professionisti inviano casi di referenza con patologia renale.

I soggetti inclusi nello studio risultano avere un'età mediana di 10 anni e 4 mesi, confermando che, sebbene la CKD sia una patologia che si può sviluppare ad ogni età, essa è più frequente in animali adulti ed anziani (Polzin, 2010). I cani maschi interi sono leggermente prevalenti rispetto alle femmine, ma i due sessi non hanno mostrato differenze significative sia per i parametri valutati, sia per l'*outcome*.

Il 31% dei cani inclusi è meticcio, ma tra i restanti soggetti non si è riscontrata prevalenza di razze particolari: le più rappresentate (Labrador Retriever e Boxer) non hanno mai superato una frequenza del 5% e questo dato può essere ricondotto principalmente alla ampia diffusione di tali razze in Italia. Una maggior frequenza di CKD in alcune delle razze più rappresentate anche in questa tesi, seppur suggerita in alcune valutazioni epidemiologiche, non può trovare conferma in questo studio.

La valutazione della creatinina sierica al momento della diagnosi, poi confermata in misurazioni ripetute, ha permesso di classificare i pazienti secondo la stadiazione IRIS. Il 65% dei soggetti è risultato appartenere agli stadi IRIS 3 e 4: questo dato conferma

quanto già affermato in precedenza, ovvero che la diagnosi di CKD è, solitamente, una diagnosi tardiva a causa della scarsa sensibilità diagnostica dei comuni *marker* laboratoristici (ad esempio, riduzione del peso specifico urinario ed aumento dei *marker* azotati), nonché dei segni clinici e delle alterazioni morfologiche renali tipiche. Inoltre, la maggior parte dei pazienti presenta ulteriori segni che supportano una nefropatia cronica caratterizzata da un significativo calo della funzionalità renale: il peso specifico urinario mediano è di 1014 (isostenuria), valore ricollegabile a una perdita di nefroni funzionanti pari almeno al 75%; l'iperfosfatemia ($P >4,9$ mg/dl) è stata individuata nel 58% dei soggetti, e la proteinuria (UPC $>0,5$) nel 74%. Tali risultati sono in linea con quanto riportato in studi precedenti (Cortadellas *et al.*, 2010).

I soggetti affetti da CKD inclusi nello studio hanno mostrato una frequenza elevata di sedimento urinario attivo, potenzialmente ricollegabile ad una infiammazione/infezione del tratto urinario. Tale dato rappresenta un risultato interessante del presente lavoro e quantifica la potenziale incidenza di infezioni del tratto urinario nei pazienti con CKD al 52%. Sebbene sia noto, infatti, che i pazienti con CKD, sia felini che canini, soffrano frequentemente di infezioni delle vie urinarie, in letteratura non è presente un dato epidemiologico universalmente accettato (per il gatto, ad esempio, si riportano frequenze anche del 30%). Nel nostro caso, tuttavia, per poter raggiungere una stima più precisa sarebbe stato utile conoscere la frequenza delle positività all'esame batteriologico urinario dei pazienti inclusi. Tale dato non è stato presentato in questo studio preliminare, ma sarà oggetto di studi futuri. I criteri utilizzati per classificare il sedimento come attivo presentano sicuramente dei limiti e oggettivamente potrebbero aver condotto ad una sovrastima delle possibili infezioni/infiammazioni del tratto urinario, soprattutto per quelle urine raccolte per minzione spontanea in soggetti di sesso maschile, nei quali è più semplice la contaminazione derivante dalle vie urogenitali inferiori.

L'ipertensione arteriosa è una complicazione nota in corso di CKD sia nel cane che nel gatto. Il nostro studio riporta una frequenza di ipertensione del 62% (considerando una soglia di pressione arteriosa sistolica di 150 mmHg). Tale dato appare in accordo con quanto riportato in precedenza da altri autori (Wehner *et al.*, 2008). Inoltre, nel nostro studio, la frequenza di pazienti ipertesi non era differente per i diversi stadi IRIS di CKD, ad indicare che l'ipertensione arteriosa è un evento frequente in corso di CKD a qualunque stadio di presentazione clinica. Infine, il ruolo della pressione arteriosa come

fattore prognostico, come suggerito in studi precedenti (Jacob *et al.*, 2003; Wehner *et al.*, 2008) e come ben noto in medicina umana, ha trovato solo conferme parziali nel nostro lavoro.

In merito ai segni clinici, studi precedenti con approccio paragonabile al nostro (O'Neill *et al.*, 2013) riportano le seguenti frequenze: anoressia 39,5%, PU/PD 43%, vomito 50%, perdita di peso 29%. Il nostro studio riporta invece frequenze differenti: anoressia 37%, PU/PD 35%, vomito 27%, perdita di peso 16,5%. I nostri risultati, quindi, mostrano prevalenze inferiori rispetto a quanto presente in letteratura e tale dato dovrà essere confermato in studi successivi. I segni riportati nel nostro studio hanno frequenze statisticamente differenti al variare dello stadio IRIS di CKD; in particolare, gli stadi maggiormente avanzati di CKD presentano una maggior frequenza di anoressia, perdita di peso, vomito, PU/PD e pallore mucosale rispetto agli stadi iniziali, ad indicare che i sintomi caratteristici e maggiormente riportati in letteratura per la CKD sono in realtà più tipici dei soggetti in stadio 3 o 4.

La valutazione prognostica riportata nel nostro studio ha consentito di individuare 119/321 pazienti deceduti o sottoposti ad eutanasia per cause legate direttamente alla CKD. Per quanto possibile, altre cause di morte sono state escluse, anche se è necessario sottolineare come in alcuni soggetti, ad esempio affetti da numerose comorbidità, tale valutazione sia stata decisamente complessa. La presenza di comorbidità e complicazioni associate alla CKD è stata oggetto di questo lavoro sperimentale, poiché fondamentale per una corretta determinazione dell'*outcome*; tuttavia tali risultati (frequenza e tipo di comorbidità e complicazioni) non sono stati qui presentati.

La sopravvivenza media dei nostri pazienti è stata di 197 giorni dal momento della diagnosi. La letteratura veterinaria consultata è povera di dati paragonabili, tuttavia il nostro risultato appare in linea con quanto riportato da Jacob e colleghi (Jacob *et al.*, 2005), anche se per un numero inferiore di soggetti. Altri lavori, che includono rispettivamente pazienti con Leishmaniosi (Geisweid *et al.*, 2012) e malattia renale (Wehner *et al.*, 2008) riportano sopravvivenze maggiori.

L'analisi statistica univariata ha consentito di individuare numerosi parametri di laboratorio potenzialmente associati all'*outcome* finale. Tra questi, sembrano avere un ruolo importante nella riduzione del rischio di morte il rapporto albumine/globuline e la

concentrazione di albumine, che ad ogni incremento di 1 unità mostrano una riduzione del rischio del 87% e del 45% rispettivamente; al contrario, un aumento della concentrazione di creatinina sierica e di fosforo di 1 unità incrementano la possibilità di morte del 19% e del 14% rispettivamente.

Le concentrazioni di fosforo, risultato interessante del presente lavoro, sembrano essere significativamente associate all'*outcome* anche nell'analisi multivariata, confermando le potenzialità prognostiche di questo parametro anche nel paziente con CKD così come in altri *setting* clinici (Fracassi et al., 2014).

L'analisi di sopravvivenza tramite curve di Kaplan-Meier per i pazienti deceduti ha fornito i risultati più importanti del presente lavoro.

Valori elevati di creatinina al momento della diagnosi sono significativamente associati ad una riduzione della sopravvivenza del paziente con CKD, sia fissando una soglia a 2 mg/dl, sia a 3,5 mg/dl. Anche valori elevati di urea, valutati utilizzando una concentrazione sierica di 150 mg/dl come *cut-off*, hanno dimostrato di influire negativamente sulla sopravvivenza. L'insieme di questi dati indica come lo stadio della malattia renale cronica abbia realmente una associazione con la riduzione della sopravvivenza, così come suggerito in studi precedenti nel cane, nel gatto e nell'uomo.

Questo risultato è supportato anche dalla valutazione delle concentrazioni di fosforo: esse sono significativamente associate ad una riduzione della sopravvivenza quando, al momento della diagnosi, sono > 4,5 mg/dl, ovvero appena al di sopra del limite superiore dell'intervallo di riferimento del nostro laboratorio ed in analogia con quello di altri laboratori veterinari. Un aumento delle concentrazioni di fosforo nel paziente affetto da CKD è solitamente imputabile da un lato alla progressiva riduzione della funzionalità renale, e dall'altro alla comparsa di iperparatiroidismo secondario. Come riportato nella parte generale, è nota nell'uomo l'associazione tra iperparatiroidismo secondario renale e riduzione della prognosi in corso di CKD, e questa condizione, seppur già suggerita nel cane e nel gatto, potrebbe trovare ulteriore conferma in questo studio. Il limite principale del nostro studio risiede nel fatto che non sono stati testati *marker* più specifici di iperparatiroidismo (PTH, FGF-23) i quali, tuttavia, sono di difficile applicabilità in medicina veterinaria a causa dei costi analitici elevati e della scarsa accuratezza dei risultati. Una valutazione simile potrà essere eseguita in studi futuri.

Nel paziente con CKD, la proteinuria rappresenta un fattore prognostico negativo ben noto in medicina umana, così come riportato in precedenza. Studi recenti hanno

suggerito e confermato statisticamente che tale condizione si associa ad una prognosi peggiore e ad una riduzione dei tempi di sopravvivenza anche nel cane e nel gatto (Jacob *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2006; Wehner *et al.*, 2008;). Il nostro studio conferma tale riscontro, indicando come una proteinuria, rilevata al momento della diagnosi di CKD, ed espressa come “rapporto proteine urinarie su creatinina urinaria” (UPC) ≥ 1 , ma anche $\geq 0,5$ (ovvero appena al di sopra del valore soglia attualmente suggerito da IRIS), sia associata significativamente ad una riduzione dei tempi di sopravvivenza. Il nostro lavoro, tuttavia, così come altri presenti in letteratura (Jacob *et al.*, 2005), non ha considerato il ruolo di eventuali terapie antiproteinuriche sulla sopravvivenza, che potranno essere valutate in futuro, o meglio in studi prospettici strutturati ad hoc.

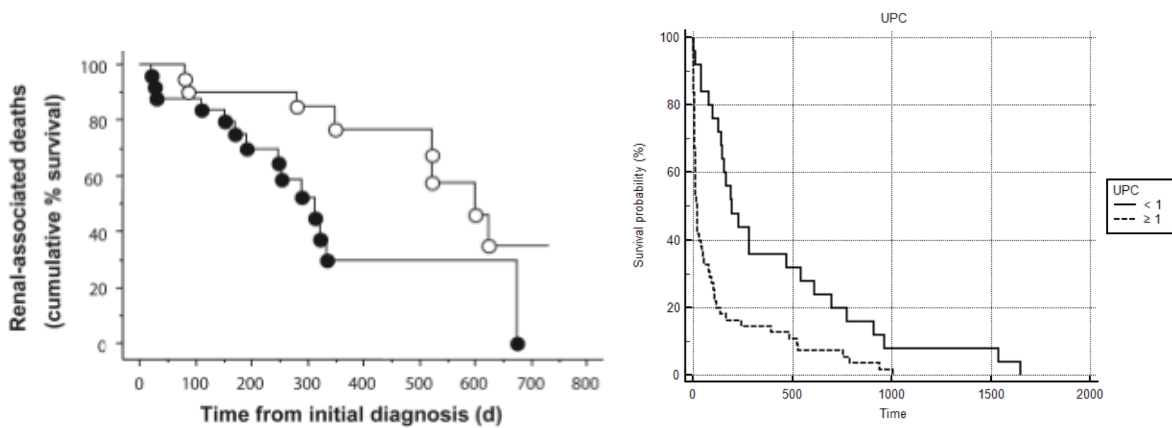


Figura 8.1: A sinistra, la curva Kaplan-Meier risultata dallo studio di Jacob e colleghi (Jacob *et al.*, 2005), in cui i cerchi neri rappresentano valori di UPC ≥ 1 e i cerchi bianchi valori di UPC < 1 . A destra, la curva Kaplan-Meier risultata dal nostro lavoro, in cui la riga tratteggiata rappresenta valori di UPC ≥ 1 e quella nera valori di UPC < 1 . I tempi di sopravvivenza sono maggiori nello studio di Jacob.

Un risultato importante del nostro studio è quello rappresentato dal potenziale prognostico espresso dalle proteine di fase acuta positive (CRP) e negative (albumina e transferrina), in associazione al rapporto albumine/globuline. In particolar modo, una concentrazione di CRP ≥ 1 mg/dl (ovvero al di sopra dell'intervallo di riferimento) al momento della diagnosi è significativamente associata ad una riduzione dei tempi di sopravvivenza; lo stesso risultato è stato riscontrato con una concentrazione di albumina $< 2,0$ g/dl, una concentrazione di transferrina (TIBC) < 280 μ g/dl e un rapporto A/G $< 0,6$. Una possibile spiegazione del valore prognostico di tali parametri risiede nel ruolo prognostico negativo dell'infiammazione nel paziente con CKD: tale ruolo è stato suggerito e dimostrato nell'uomo e avrebbe alla base numerosi possibili meccanismi

(sviluppo di anemia, complicazioni gastroenteriche, neoplasie, etc), ma dati analoghi sono mancanti in medicina veterinaria. Una seconda possibile spiegazione risiede nel fatto che potenzialmente tutti questi parametri (albumina, transferrina, A/G e CRP) possono essere influenzati dalla presenza di proteinuria nel paziente con CKD e di conseguenza potrebbero confermare quanto già presentato in precedenza per l'UPC. Nel nostro studio, infine, è stato oggetto di valutazione anche il valore ematocrito, che è risultato significativamente associato a diminuiti tempi di sopravvivenza per valori inferiori al 35%. Poiché il calo dell'ematocrito è solitamente associato a stadi avanzati di CKD, il nostro lavoro ne conferma il potenziale ruolo prognostico negativo.

In conclusione, il presente studio ha permesso di individuare alcuni importanti fattori prognostici per la sopravvivenza in pazienti con CKD. Oltre a fattori ben noti in letteratura, come ad esempio elevati valori di creatinina e fosforo, o la presenza di proteinuria, è stato possibile anche evidenziare il ruolo prognostico negativo di alcuni parametri meno noti, ed in particolare delle proteine di fase acuta positive e negative, e del rapporto albumina/globuline.

BIBLIOGRAFIA

- **Abbate *et al.*, 2006**
Abbate M., Zoja C., Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *Journal of the American Society of Nephrology* 17: 2974-2984, 2006
- **Adrogué e Madias, 1998**
Adrogué H., Madias N. Management of life-threatening acid-base disorders. *The New England Journal of Medicine* 338: 26-34, 1998
- **Anderstam *et al.*, 1996**
Anderstam B., Mamoun A.H., Södersten P., Bergström J. Middle-sized molecule fractions isolated from uremic ultrafiltrate and normal urine inhibit ingestive behavior in the rat. *Journal of the American Society of Nephrology* 7(11): 2453-60, 1996
- **Ärnlöv *et al.*, 2005**
Ärnlöv J., Evans J.C., Meigs J.B., Wang T.J., Fox C.S., Levy D., Benjamin E.J., D'Agostino R.B., Vasan R.S. Low-Grade Albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: The Framingham Heart Study. *Circulation* 112: 969-975, 2005
- **Aros e Remuzzi, 2002**
Aros C., Remuzzi G. The renin-angiotensin system in progression, remission and regression of chronic nephropathies. *Journal of Hypertension* 20(Suppl 3):S45-S53, 2002
- **Basile, 2004**
Basile D.P. Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing progressive nephropathy. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 13: 1-13, 2004
- **Barnes e Gorin, 2011**
Barnes J.L., Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney International* 79: 944-56, 2011
- **Bartges *et al.*, 1996**
Bartges J.W., Willis A.M., Polzin D.J. Hypertension and renal disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 26: 1331-1345, 1996
- **Bello *et al.*, 2010**
Bello A., Kawar B., El Kossi M., El Nahas M. Epidemiology and pathophysiology of chronic kidney disease. In: Jürgen Floege Richard J. Johnson, John Feehally. *Comprehensive Clinical Nephrology*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 2010
- **Bianchi *et al.*, 2003**
Bianchi S., Bigazzi R., Caiazza A., Campese V.M. A controlled, prospective study of the effects of atorvastatin on proteinuria and progression of kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases* 41(3): 565-570, 2003
- **Bidani e Griffin, 2002**
Bidani A.K., Griffin K.A. Long-term renal consequences of hypertension for normal and diseased kidneys. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 11: 73-80, 2002

- **Boyd et al., 2008**
Boyd L.M., Langston C., Thompson K., Zivin K., Imanishi M. Survival in cats with naturally occurring chronic kidney disease (2000–2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22: 1111-1117, 2008
- **Brenner et al., 2001**
Brenner B.M., Cooper M.E., de Zeeuw D., Keane W.F., Mitch W.E., Parving H.H., Remuzzi G., Snapinn S.M., Zhang Z., Shahinfar S. RENAAL Study Investigators: Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 345: 861-869, 2001
- **Brown et al., 1991**
Brown S.A., Crowell W.A., Barsanti J.A., et al. Beneficial effects of dietary mineral restriction in dogs with marked reduction of functional renal mass. *Journal of the American Society of Nephrology* 1: 1169-1179, 1991
- **Brown et al., 1995**
Brown S., Finco D., Navar L. Impaired renal autoregulatory ability in dogs with reduced renal mass. *Journal of the American Society of Nephrology* 5: 1768-1774, 1995
- **Brown et al., 1997**
Brown S., Crowell W., Brown C., et al. Pathophysiology and management of progressive renal disease. *The Veterinary Journal* 154: 93-109, 1997
- **Brown et al., 2007a**
Brown S., Atkins C., Bagley R., et al. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21: 542-558, 2007
- **Brown, 2007b**
Brown, S.A. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology*, edited by J. Elliott and G.F. Grauer, 2nd edition. Gloucester, England: British Small Animal Veterinary Association, 2007 pp. 223-230.
- **Brownlee, 2001**
Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865): 813-820, 2001
- **Chagnac et al., 2000**
Chagnac A., Weinstein T., Korzets A., et al. Glomerular hemodynamics in severe obesity. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 278: F817-F822, 2000
- **Chakrabarti et al., 2012**
Chakrabarti S., Syme H.M., Elliott J. Clinicopathological variables predicting progression of azotemia in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26: 275-281, 2012
- **Chew, 2011**
Chew D.J., DiBartola S.P., Schenck P.A. *Canine and feline nephrology and urology*. Seconda edizione. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders; 2011.

- **Coca et al., 2012**
Coca S.G., Ismail-Beigi F., Haq N., Krumholz H.M., Parikh C.R. Role of intensive glucose control in development of renal end points in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Archives of Internal Medicine* 172(10): 761-769, 2012
- **Coresh et al., 2003**
Coresh J., MD, Astor B.C., Greene T., Eknoyan G., Levey A.S. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *American Journal of Kidney Diseases* 41: 1-12, 2003
- **Cortadellas et al., 2010**
Cortadellas O., del Palacio M.J.F., Talavera J., et al. Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at different stages of severity. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24: 73-79, 2010
- **Cowgill et al., 1998**
Cowgill L.D., James K.M., Levy J.K. et al. Use of recombinant human erythropoietin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 212: 521-528, 1998
- **Cravedi et al., 2010**
Cravedi P., Ruggenenti P., Remuzzi G. Which antihypertensive drugs are the most nephroprotective and why? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 1(16): 2651-2663, 2010
- **Cravedi e Remuzzi, 2013**
Cravedi P. e Remuzzi G. Pathophysiology of proteinuria and its value as an outcome measure in chronic kidney disease. *British Journal of Clinical Pharmacology* 76:4 516-523, 2013
- **D'Amico, 1999**
D'Amico G. Tubulointerstitium as predictor of progression of glomerular diseases. *Nephron* 83: 289-295, 1999
- **de Goeij et al., 2012**
de Goeij M.C.M., Liem M., de Jager D.J., Voormolen N., Sijpkens Y.W.J., Rotmans J.I., Boeschoten E.W., Dekker F.W., Grootendorst D.C., Halbesma N. and the PREPARE-1 Study Group. Proteinuria as a risk marker for the progression of chronic kidney disease in patients on predialysis care and the role of angiotensin-converting enzyme inhibitor/angiotensin II receptor blocker treatment. *Nephron Clinical Practice* 121: c73-c82, 2012
- **Elliott, 2006**
Elliott D.A. Nutritional management of chronic renal disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics Small Animal Practice* 36: 1377-1384, 2006
- **Elliott e Barber, 1998**
Elliott J., Barber P.J. Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *Journal of Small Animal Practice* 39: 78-85, 1998
- **Elliott et al., 2003**
Elliott J., Syme H.M., Markwell P.J. Acid-base balance of cats with chronic renal failure: effect of deterioration in renal function. *Journal of Small Animal Practice* 44: 261-268, 2003

- **Epstein, 2001**
Epstein M. Aldosterone as a mediator of progressive renal disease: pathogenic and clinical implications. *American Journal of Kidney Diseases* 37: 677-688, 2001
- **Finco, 2004**
Finco D.R. Association of Systemic Hypertension with Renal Injury in Dogs with Induced Renal Failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18: 289-294, 2004
- **Finco et al., 1992**
Finco D., Brown S., Crowell W., et al. Effects of dietary phosphorus and protein in dogs with chronic renal failure. *American Journal of Veterinary Research* 53: 2264-2271, 1992
- **Fracassi et al., 2014**
Fracassi F., Corradini S., Floriano D., Boari A., Aste G., Pietra M., Bergamini F.P., Dondi F. Prognostic factors for survival in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism treated with trilostane. *Veterinary Records* vetrec-2014-102546 Published Online First 28 August 2014
- **Gagliardini et al., 2010**
Gagliardini E., Conti S., Benigni A., Remuzzi G., Remuzzi A. Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *Journal of the American Society of Nephrology* 21: 2081-2089, 2010
- **Garland, 2014**
Garland J.S. Elevated body mass index as a risk factor for chronic kidney disease: current perspectives. *Journal of Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 7: 347-355, 2014
- **Garland et al., 2013**
Garland J.S., Holden R.M., Hopman W.M., Gill S.S., Nolan R.L., Morton A.R. Body mass index, coronary artery calcification, and kidney function decline in stage 3 to 5 chronic kidney disease patients. *Journal of Renal Nutrition* 23(1): 4-11, 2013
- **Geddes et al., 2013**
Geddes R.F., Finch N.C., Syme H.M., Elliott J. The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 23(2): 122-133, 2013
- **Geisweid et al., 2012**
Geisweid K., Mueller R., Sauter-Louis C., Hartmann K. Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. *Veterinary Record* 171:399, 2012
- **Goldstein et al., 1998**
Goldstein R.E., Marks S.L., Kass P.H., et al. Gastrin concentrations in plasma of cats with chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213: 826-828, 1998
- **Grauer, 2011**
Grauer G.F. Proteinuria: measurement and interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3): 121-127, 2011

- **Gutierrez et al., 2005**
Gutierrez O., Isakova T., Rhee E., Shah A., Holmes J., Collerone G., et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 16(7): 2205-15, 2005
- **Halimi et al., 2000**
Halimi J.M., Giraudeau B., Vol S., Cacès E., Nivet H., Lebranchu Y., Tichet J. Effects of current smoking and smoking discontinuation on renal function and proteinuria in the general population. *Kidney International* 58: 1285-1292, 2000
- **Haroun et al., 2003**
Haroun M.K., Jaar B.G., Hoffman S.C., Comstock G.W., Klag M.J., Coresh J. Risk factors for chronic kidney disease: A prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland. *Journal of the American Society of Nephrology* 14: 2934-2941, 2003
- **Harris e Neilson, 2006**
Harris, R.C., Neilson E.G. Toward a unified theory of renal progression. *The Annual Review of Medicine* 57: 365-380, 2006
- **Henegar et al., 2001**
Henegar J.R., Bigler S.A., Henegar L.K., et al. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *Journal of the American Society of Nephrology* 12:1211-1217, 2001
- **Hermans et al., 2007**
Hermans M.M.H, Henry R., Dekker J.M., Kooman J.P., Kostense P.J., Nijpels G., Heine R.J., Stehouwer C.D.A. Estimated glomerular filtration rate and urinary albumin excretion are independently associated with greater arterial stiffness: The Hoorn Study. *Journal of the American Society of Nephrology* 18: 1942-1952, 2007
- **Hostetter, 2004**
Hostetter T.H. Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney International* 66: 1-9, 2004
- **Hostetter et al., 2011**
Hostetter T.H., Olson J.L., Rennke H.G., Venkatachalam M.A., Brenner B.M. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Journal of the American Society of Nephrology* 12(6): 1315-25, 2011
- **Hsu et al., 2006**
Hsu C.Y., McCulloch C.E., Iribarren C., et al. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Annals of Internal Medicine* 144: 21-28, 2006
- **Ibrahim e Hostetter, 2001**
Ibrahim H.N., Hostetter T. Aldosterone in renal disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 10: 105-110, 2001
- **IRIS**
International Renal Interest Society
www.iris-kidney.com

- **Iseki, 2005**
Iseki K. Factors influencing the development of end-stage renal disease. *Clinical and Experimental Nephrology* 9: 5-14, 2005
- **Iseki et al., 1996**
Iseki K., Iseki C., Ikemiya Y., Fukiyama K. Risk of developing end-stage renal disease in a cohort of mass screening. *Kidney International* 49: 800-5, 1996
- **Ishani et al., 2009**
Ishani A., Xue J.L., Himmelfarb J., Eggers P.W., Kimmel P.L., Molitoris B.A., and Collins A.J. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *Journal of the American Society of Nephrology* 20: 223-228, 2009
- **Jacob et al., 2002**
Jacob F., Polzin D.J., Osborne C.A., Allen T.A., Kirk C.A., Neaton J.D., et al. Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic renal failure in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220(8): 1163-70, 2002
- **Jacob et al., 2003**
Jacob F., Polzin D.J., Osborne C.A., et al. Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or dying in dogs with chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222:322-329, 2003
- **Jacob et al., 2005**
Jacob F., Polzin D.J., Osborne C.A., et al. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226(3): 393-400, 2005
- **Jepson et al., 2007**
Jepson R.E., Elliott J., Brodbelt D., Syme H.M. Effect of control of systolic blood pressure on survival in cats with systemic hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21: 402-409, 2007
- **Johnson e Schreiner, 1997**
Johnson R.J., Schreiner G.F. Hypothesis: the role of acquired tubulointerstitial disease in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Kidney International* 52: 1169-1179, 1997
- **Kasiske e Crosson, 1986**
Kasiske B.L., Crosson J.T. Renal disease in patients with massive obesity. *Archives of Internal Medicine* 146: 1105-1109, 1986
- **Kiberd e Clase et al., 2002**
Kiberd B.A., Clase C.M. Cumulative Risk for Developing End-Stage Renal Disease in the US Population. *Journal of the American Society of Nephrology* 13: 1635-1644, 2002
- **King et al., 2007**
King J.N., Tasker S., Gunn-More D.A., et al. Prognostic factors in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21: 906-916, 2007

- **Klag *et al.*, 1996**
Klag M.J., Whelton P.K., Randall B.L., Neaton J.D., Brancati F.L., Ford C.E., Shulman N.B., Stamler J. Blood pressure and end-stage renal disease. *The New England Journal of Medicine* 334: 13-8, 1996
- **Kobayashi *et al.*, 1990**
Kobayashi D.L., Peterson M.E., Graves T.K., *et al.* Hypertension in cats with chronic renal failure or hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4: 58-62, 1990
- **Köttgen *et al.*, 2008**
Köttgen A., Hwang S., Rampersaud E., *et al.* TCF7L2 variants associate with CKD progression and renal function in population-based cohorts. *Journal of the American Society of Nephrology* 19: 1989-1999, 2008
- **Köttgen *et al.*, 2009**
Köttgen A., Glazer N.L., Dehghan A., *et al.* Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nature Genetics* 41(6): 712-717, 2009
- **Kyles *et al.*, 1999**
Kyles A., Gregory C.R., Woolridge J.D., *et al.* Management of hypertension controls postoperative neurological disorders after renal transplantation in cats. *Veterinary Surgery* 28: 436-441, 1999
- **Lees *et al.*, 2005**
Lees G.E., Brown S.A., Elliott J., Grauer G.E., Vaden S.L.; American College of Veterinary Internal Medicine. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM forum consensus statement (small animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 377-385, 2005
- **Lees, 2007**
Lees G.E. Juvenile and familial nephropathies. In: Elliot J, Grauer F (eds.). *BSAVA Manual of canine and feline nephrology and urology*. 2nd edn BSAVA, 2007 pp 79-86
- **Lefebvre, 2011**
Lefebvre H.P. Renal function testing. In: Bartges J, Polzin DJ, editors. *Nephrology and urology of small animals*. Ames (IA): Wiley-Blackwell; 2011. pp. 91-96
- **Levey *et al.*, 2009**
Levey A.S., Stevens L.A., Schmid C.H., *et al.* for the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of Internal Medicine* 150(9): 604-612, 2009
- **Ljutić e Kes, 2003**
Ljutić D., Kes P. The role of arterial hypertension in the progression of non-diabetic glomerular diseases. *Nephrology Dialysis Transplantation* 18(5): 28-30, 2003
- **Locatelli *et al.*, 1996**
Locatelli F., Marcelli D., Comelli M., Alberti D., Graziani G., Buccianti G., Redaelli B., Giangrande A. and the Northern Italian Cooperative Study Group, Italy. Proteinuria and blood pressure as causal components of progression to end-stage renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* 11: 461-67, 1996

- **Lulich *et al.*, 1992**
Lulich J.P., Osborne C.A., O'Brien R.D., Polzin D.J. Feline renal failure: questions, answers, questions. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 14: 127-152, 1992
- **Maclsaac *et al.*, 2014**
Maclsaac R.J., Ekinci E.I., Jerums G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases* 63(2): 39-62, 2014
- **Mathur *et al.*, 2002**
Mathur S., Syme H.M., Brown C.A., *et al.* Effects of the calcium channel antagonist amlodipine in cats with surgically induced hypertensive renal insufficiency. *American Journal of Veterinary Research* 63: 833-839, 2002
- **McClennan e Flanders, 2003**
McClennan W.M., Flanders D.W. Risk factors for progressive chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 14: S65-S70, 2003
- **McLeland *et al.*, 2014**
McLeland S.M., Lunn K.F., Duncan C.G., Refsal K.R., Quimby J.M. Relationship among serum creatinine, serum gastrin, calcium-phosphorus product, and uremic gastropathy in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28: 827-837, 2014
- **Minkus *et al.*, 1994**
Minkus G., Reusch C., Horauf A., *et al.*: Evaluation of renal biopsies in cats and dogs-histopathology in comparison with clinical data. *Journal of Small Animal Practice* 35: 465-472, 1994
- **Mitch, 1997**
Mitch W. Mechanisms causing loss of lean body mass in kidney disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67:359-366, 1997
- **Molnar *et al.*, 2014**
Molnar M.Z., Kalantar-Zadeh K., Lott E.H., Lu J.L., Malakauskas S.M., Ma J.Z., Quarles D.L., Kovesdy C.P. Angiotensin-converting enzyme inhibitor, angiotensin receptor blocker use, and mortality in patients with chronic kidney disease. *Journal of the American College of Cardiology* 63(7): 650-658, 2014
- **Morales *et al.*, 2003**
Morales E., Valero M.A., Leòn M., Hernandez E., Praga M. Beneficial effects of weight loss in overweight patients with chronic proteinuric nephropathies. *American Journal of Kidney Diseases* 41(2):319-327, 2003
- **Nagode *et al.*, 1996**
Nagode L.A., Chew D.J., Podell M. Benefits of calcitriol therapy and serum phosphorus control in dogs and cats with chronic renal failure. Both are essential to prevent of suppress toxic hyperparathyroidism. *Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice* 26(6): 1293-330, 1996

- **Nath, 1998**
Nath K. The tubulointerstitium in progressive renal disease. *Kidney International* 54: 992-994, 1998
- **Nitsch et al., 2013**
Nitsch D., Grams M., Sang Y., et al. for the Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex: a meta-analysis. *British Medical Journal* 346:f324, 2013
- **Norman e Fine, 2006**
Norman J., Fine L.G. Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33: 989-996, 2006
- **O'Neill et al., 2013**
O'Neill D.G., Elliott J., Church D.B., et al. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices: Prevalence, risk factors, and survival. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27: 814-21, 2013
- **Odoni et al., 2002**
Odoni G., Ogata H., Viedt C., Amann K., Ritz E., Orth S.R. Cigarette smoke condensate aggravates renal injury in the renal ablation model. *Kidney International* 61: 2090-2098, 2002
- **Orth, 2002**
Orth S.R. Smoking and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 13: 1663-1672, 2002
- **Orth, 2004**
Orth S.R. Effects of smoking on systemic and intrarenal hemodynamics: Influence on renal function. *Journal of the American Society of Nephrology* 15(1): S58-S63, 2004
- **Orth e Hallan, 2008**
Orth S.R., Hallan S.I. Smoking: a risk factor for progression of chronic kidney disease and for cardiovascular morbidity and mortality in renal patients - Absence of evidence or evidence of absence? *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3: 226-236, 2008
- **Paepe e Daminet, 2013**
Paepe D., Daminet S. Feline CKD: Diagnosis, staging and screening – what is recommended? *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 15(1): 15-27, 2013
- **Papich, 2007**
Papich, M.G. Saunders *Handbook of Veterinary Drugs*, 2nd edition. St. Louis, MO: WB Saunders, 2007. pp. 379-380
- **Parsa et al., 2013**
Parsa A., Kao L., Xie D., et al. for the AASK and CRIC Study Investigators. *APOL1* risk variants, race, and progression of chronic kidney disease. *New England Journal of Medicine* 369: 2183-96, 2013
- **Perkovic et al., 2013**
Perkovic V., Heerspink H.L., Chalmers J., et al. Intensive glucose control improves kidney outcomes in patients with type 2 diabetes. *Kidney International* 83: 517-523, 2013

- **Peters *et al.*, 2005**
Peters R.M., Goldstein R.E., Erb H.N., Njaa B.L. Histopathologic features of canine uremic gastropathy: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19(3): 315-20, 2005
- **Peterson *et al.*, 1995**
Peterson J.C., Adler S., Burkart J.M., Greene T., Hebert L.A., Hunsicker L.G., King A.J., Klahr S., Massry S.G., Seifter J.L., and Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The modification of diet in renal disease study. *Annals of Internal Medicine* 123: 754-62, 1995
- **Polzin, 2010**
Polzin D.J. Chronic kidney disease. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. Settima edizione. St. Louis, Mo.: Elsevier Saunders; 2010.
- **Polzin, 2011**
Polzin D.J. Chronic kidney disease. In: Bartges J, Polzin DJ, editors. *Nephrology and urology of small animals*. Ames (IA): Wiley-Blackwell; 2011. pp. 433-71.
- **Randolph *et al.*, 2004**
Randolph J.E., Scarlett J., Stokol T., MacLeod J.N. Clinical efficacy and safety of recombinant canine erythropoietin in dogs with anemia of chronic renal failure and dogs with recombinant human erythropoietin-induced red cell aplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18(1): 81-91, 2004
- **Remuzzi *et al.*, 2005**
Remuzzi G., Perico N., Macia M., Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney International* 68(99):S57-S65, 2005
- **Rennke *et al.*, 2007**
Rennke H.G., Denker B.M., Rose B.D. *Renal pathophysiology: the essentials*. Seconda edizione. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007
- **Roncal Jimenez *et al.*, 2014**
Roncal Jimenez C.A., Ishimoto T., Lanaspa M.A. *et al.* Fructokinase activity mediates dehydration-induced renal injury. *Kidney International* 86(2):294-302, 2014
- **Ross *et al.*, 2006**
Ross S.J., Osborne C.A., Kirk C.A., Lowry S.R., Koehler L.A., Polzin D.J. Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic kidney disease in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229: 949-957, 2006
- **Ross, 2011**
Ross S.J. Azotemia and uremia. In: Bartges J, Polzin DJ, editors. *Nephrology and urology of small animals*. Ames (IA): Wiley-Blackwell; 2011. pp. 393-399
- **Ruggenenti *et al.*, 1997**
Ruggenenti P., Perna A., Mosconi L., Matalone M., Pisoni R., Gaspari F., Remuzzi G. on behalf of the the "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN). Proteinuria

predicts end-stage renal failure in non-diabetic chronic nephropathies. *Kidney International Supplements* 63: S54-7, 1997

- **Ruggenenti *et al.*, 1998**

Ruggenenti P., Perna A., Mosconi L., Pisoni R., Remuzzi G. on behalf of the “Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia” (GISEN). Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. *Kidney International* 53:1209-16, 1998

- **Ruggenenti *et al.*, 2012**

Ruggenenti P., Cravedi P., Remuzzi G. Mechanisms and treatment of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 23: 1917-1928, 2012.

- **Ruiz-Ortega *et al.*, 2001**

Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Suzuki Y., *et al.* Pro-inflammatory actions of angiotensins. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 10:321-329, 2001

- **Satko *et al.*, 2007**

Satko S.G., Sedor J.R., Iyengar S.K., Freedman B.I. Familial Clustering of Chronic Kidney Disease. *Seminars in Dialysis* 20(3): 229-236, 2007

- **Schneider *et al.*, 2013**

Schneider S.M., Cianciolo R.E., Nabity M.B., Clubb F.J. Jr, Brown C.A., Lees GE. Prevalence of immune-complex glomerulonephritides in dogs biopsied for suspected glomerular disease: 501 cases (2007-2012). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27(1): S67-75, 2013

- **Sheetz e King, 2002**

Sheetz M.J., King G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *The Journal of the American Medical Association* 288(20): 2579-2588, 2002

- **Shlipak *et al.*, 2009a**

Shlipak M.G., Katz R., Kestenbaum B., Fried L.F., Newman A.B., Siscovick D.S., Stevens L., Sarnak M.J. Rate of kidney function decline in older adults: a comparison using creatinine and Cystatin C. *American Journal of Nephrology* 30: 171-178, 2009

- **Shlipak *et al.*, 2009b**

Shlipak M.G., Katz R., Kestenbaum B., Fried L.F., Siscovick D., Sarnak M.J. Clinical and subclinical cardiovascular disease and kidney function decline in the elderly. *Atherosclerosis* 204: 298-303, 2009

- **Skupien *et al.*, 2012**

Skupien J., Warram J.H., Smiles A., Galecki A., Stanton R.C., Krolewski A.S. Sustained improvement of hemoglobin A1c reduces risk of end-stage renal disease in patients with type 1 diabetes and proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology*. 23(suppl): 1163, 2012

- **Stevens *et al.*, 2010**

Stevens L.A., Viswanathan G., Weiner D.E. CKD and ESRD in the elderly: current prevalence, future projections, and clinical significance. *Advances in Chronic Kidney Disease* 17(4): 293-301, 2010

- **Stockham e Scott, 2008**
Stockham S.L., Scott M.A. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Seconda edizione. Ames, Iowa: Blackwell Pub.; 2008
- **Sud et al., 2014**
Sud M., Tangri N., Levin A., Pintilie M., Levey A.S., Naimark D.M. CKD stage at nephrology referral and factors influencing the risks of ESRD and death. *American Journal of Kidney Diseases*. 63(6): 928-936, 2014
- **Syme et al., 2002**
Syme H.M., Barber P.J., Peter J., et al. Prevalence of systolic hypertension in cats with chronic renal failure at initial evaluation. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220: 1799-1804, 2002
- **Syme et al., 2006**
Syme H.M., Markwell P.J., Pfeiffer D., et al. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29 (3): 528-535, 2006
- **Tarver-Carr et al., 2002**
Tarver-Carr M.E., Powe N.R., Eberhardt M.S., Laveist T.A., Kington R.S., Coresh J., Brancati F.L. Excess risk of chronic kidney disease among african-american versus white subjects in the United States: a population-based study of potential explanatory factors. *Journal of the American Society of Nephrology*. 13: 2363-2370, 2002
- **The GISEN Group, 1997**
The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia). Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. *Lancet* 349: 1857-1863, 1997
- **Tozawa et al., 2003**
Tozawa M., Iseki K., Iseki C., Kinjo K., Ikemiya Y., Takishita S. Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women. *Hypertension* 41:1341-1345, 2003
- **USRDS, 2010**
U.S. Renal Data System. USRDS 2010 Annual Data Report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2010. Vedi www.usrds.org
- **USRDS, 2013**
U.S. Renal Data System. USRDS 2013 Annual Data Report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013. Vedi www.usrds.org
- **Vaden, 2011**
Vaden S.L. Glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine* 26: 128-134, 2011

- **Vaziri, 2014**
Vaziri N.D. Role of dyslipidemia in impairment of energy metabolism, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clinical and Experimental Nephrology* 18:265-268, 2014
- **Wehner et al., 2008**
Wehner A., Hartmann K., Hirschberger J. Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases. *Veterinary Records* 162(5): 141-147, 2008
- **White et al., 2006**
White J.D., Norris J.M., Baral R.M., Malik R. Naturally occurring chronic renal disease in Australian cats: a prospective study of 184 cases. *Australian Veterinary Journal* 84: 188-194, 2006
- **Wolf et al., 2002**
Wolf G., Chen S., Han D.C., Ziyadeh F.N. Leptin and renal disease. *American Journal of Kidney Diseases* 39: 1-11, 2002
- **Wright et al., 2001**
Wright J.T. Jr, Bakris G., Greene T., et al. Effect of blood pressure lowering and antihypertensive drug class on progression of hypertensive kidney disease: results from the AASK trial. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 288: 2421–31, 2001