

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Diagnostica Collaterale in Medicina Veterinaria

Ciclo XX

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: VET/08 CLINICA MEDICA VETERINARIA

TITOLO TESI

**“VALUTAZIONE DEL RAPPORTO URINARIO PROTEINE
TOTALI/CREATININA E ALBUMINA/CREATININA IN CANI
AFFETTI DA IPERADRENOCORTICISMO E DA DIABETE
MELLITO”**

Tesi di Dottorato
di:
Dott.ssa ANTONELLA MAZZI

Coordinatore:
**Chiar.mo Prof.
PAOLO FAMIGLI BERGAMINI**

Relatore:
**Chiar.mo Prof.
PAOLO FAMIGLI BERGAMINI**

Esame finale anno 2008

INDICE

INDICE	I
0 INTRODUZIONE	1
1 PRESSIONE ARTERIOSA	4
1.1 MECCANISMI OMEOSTATICI CHE REGOLANO LA PRESSIONE ARTERIOSA	4
1.1.1 <i>Barocettori</i>	5
1.1.2 <i>Chemocettori centrali e periferici</i>	6
1.1.3 <i>Centri cardiovasali</i>	7
1.1.4 <i>Sistema Nervoso Autonomo (SNA)–Simpatico</i>	9
1.1.5 <i>Ormone antidiuretico (ADH o vasopressina)</i>	9
1.1.6 <i>Sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA)</i>	9
1.1.7 <i>Fattore Natriuretico Atriale (Atrial Natriuretic Factor: ANF)</i>	10
1.1.8 <i>Prostaglandine:</i>	11
1.1.9 <i>Chinine (callidina e bradichinina):</i>	11
1.1.10 <i>Aldosterone:</i>	12
1.2 METODICHE INDIRETTE PER IL RILIEVO DELLA PRESSIONE ARTERIOSA NEL CANE	12
1.2.1 <i>Doppler</i>	13
1.2.2 <i>Metodo Oscillometrico</i>	14
1.3 L'IPERTENSIONE NEL CANE	16
1.4 DIABETE MELLITO	31
1.4.1 <i>IDDM</i>	32
1.4.2 <i>NIDDM</i>	33
1.4.3 <i>Segnalamento ed Eziopatogenesi</i>	33
1.4.4 <i>Rilievi Clinici</i>	34
1.4.5 <i>Indagini Collaterali</i>	36

1.4.6	<i>Diagnosi</i>	37
1.4.7	<i>Terapia</i>	39
1.4.8	<i>Ipertensione e Diabete Mellito</i>	39
1.5	IPERADRENOCORTICISMO O IPERCORTISOLISMO (HYPERCORTISOLISM: HC)	41
1.5.1	<i>Segnalamento</i>	41
1.5.2	<i>Eziopatogenesi</i>	42
1.5.3	<i>Rilievi Clinici</i>	43
1.5.4	<i>Indagini Collaterali</i>	45
1.5.5	<i>Diagnosi</i>	46
1.5.6	<i>Terapia</i>	50
1.5.7	<i>Ipercortisolismo (HC) ed Ipertensione</i>	54
2	LA PROTEINURIA	60
2.1	LA FILTRAZIONE GLOMERULARE	60
2.2	IL RIASSORBIMENTO TUBULARE	64
2.3	CLASSIFICAZIONE DELLA PROTEINURIA:	65
2.3.1	<i>Proteinuria Fisiologica</i>	65
2.3.2	<i>Proteinuria Funzionale</i>	66
2.3.3	<i>Proteinuria Patologica</i>	66
2.4	VALUTAZIONE SEMIQUANTITATIVA DELLA PROTEINURIA.....	70
2.5	ANALISI QUANTITATIVA DELLA PROTEINURIA	73
2.5.1	<i>U:P/C</i>	74
2.6	ANALISI QUALITATIVA DELLA PROTEINURIA	78
2.6.1	<i>Immunodiffusione</i>	78
2.6.2	<i>Tecniche Elettroforetiche</i>	79
2.7	MICROALBUMINURIA (MA)	84
2.8	PROTEINURIA E DIABETE MELLITO	92
2.9	PROTEINURIA E IPERADRENOCORTICISMO (O IPERCORTISOLISMO: HC)	95
3	MATERIALE E METODI	99
3.1	SELEZIONE DEI SOGGETTI	99

3.1.1	<i>Collezione e stoccaggio dei campioni</i>	100
3.2	ANALISI	101
3.2.1	<i>Esame chimico-fisico e del sedimento urinari</i>	101
3.2.2	<i>Rapporto urinario proteine totali/creatinina</i>	102
3.2.3	<i>Microalbuminuria</i>	103
3.2.4	<i>Misurazione della Pressione arteriosa (Pa)</i>	104
4	RISULTATI	107
5	CONCLUSIONI	120
6	BIBLIOGRAFIA	126

0 INTRODUZIONE

In Medicina Umana, già da diverso tempo, si utilizzano i termini macroproteinuria e microproteinuria. Entrambi si riferiscono ad una patologica escrezione urinaria di albumine ed indicano la presenza di una disfunzione renale, ma assumono un significato clinico e prognostico diverso. In particolare, la macroproteinuria, rappresenta l'inevitabile progressione della microproteinuria nel caso in cui non si realizzino le adeguate misure terapeutiche atte ad impedirne, o quanto meno a rallentarne l'evoluzione. La proteinuria, nell'uomo, rappresenta la conseguenza di numerose patologie frequentemente associate ad ipertensione sistemica. Nella maggior parte dei casi, in Medicina Umana, l'ipertensione è primaria od essenziale e si definisce come tale poiché non associata ad una patologia sottostante, ma causata da alterazioni vascolari relazionate all'avanzare dell'età e ad altri fattori. L'esito è caratterizzato da fenomeni aterosclerotici in grado di ridurre l'elasticità vascolare e, quindi, di aumentare le resistenze periferiche vascolari determinando ipertensione sistemica. Nei nostri animali, al contrario, l'ipertensione sistemica più di frequente è secondaria ad altre patologie, mentre l'ipertensione primaria od essenziale è molto rara e, forse, più difficile da diagnosticare data la maggiore limitazione degli strumenti e delle possibilità diagnostiche della Medicina Veterinaria rispetto alla Medicina Umana.

La microalbuminuria, nell'uomo, è definita come la concentrazione urinaria patologica di piccole quantità di albumina compresa tra 20 e 200 $\mu\text{g}/\text{min}$ in presenza di una normale diuresi (2-20 mg/dl). Al di sopra di 200 $\mu\text{g}/\text{min}$ (> 20 mg/dl) si parla di macroproteinuria. Nel cane la microalbuminuria rappresenta la quota urinaria di albumina non rilevabile attraverso le normali tecniche semiquantitative ed essendo la valutazione

dell'escrezione proteica nelle 24 ore di difficile attuazione nell'attività clinica quotidiana, la valutazione di U:A/C la rappresenta con buona approssimazione.

L'ipertensione frequentemente affligge l'uomo diabetico ed è considerata la causa maggiore di proteinuria. È stato dimostrato che le persone affette da diabete mellito che presentano microalbuminuria, pur non presentando proteinuria all'esame chimico-fisico di base, sono venti volte più a rischio di sviluppare una nefropatia clinicamente manifesta e una proteinuria persistente rispetto agli individui non microalbuminurici. Nel caso di presenza di microalbuminuria la prognosi è decisamente meno favorevole poiché il rischio di mortalità aumenta di tre-quattro volte. Queste motivazioni hanno attribuito estrema rilevanza clinica e prognostica alla microalbuminuria che, nell'uomo, rappresenta un *marker* precoce e sensibile di danno renale e mezzo utile per un più precoce intervento terapeutico.

Anche l'iperadrenocorticismo, sia nell'uomo che nel cane, frequentemente è caratterizzato dalla presenza di ipertensione e proteinuria più o meno gravi e che non in tutti i casi si risolvono in seguito a correzione dell'ipercortisolemia.

Anche in Medicina Umana, nonostante la presenza di più appropriati mezzi diagnostici e terapeutici rispetto alla Medicina Veterinaria, non è a tutt'oggi chiaro se l'ipertensione sia causa o conseguenza della nefropatia associata ad entrambe le disendocrinie sopra citate, ma, tuttavia, l'utilizzo della microalbuminuria come *marker* precoce e come strumento di monitoraggio accanto al controllo dell'ipertensione sistemica rappresentano i mezzi più appropriati per limitare le complicanze cardiovascolari sistemiche e renali ad essi associati.

Nei nostri animali il termine microalbuminuria è stato introdotto solo di recente poiché le tradizionali metodiche impiegate per lo *screening* della

proteinuria non erano in grado di rilevare la quantità di albumine che ricade nell'intervallo che definisce la microalbuminuria. Data l'introduzione recente di questo parametro, ancora poco si conosce riguardo al significato clinico e prognostico della stessa, anche se sembra aumentare in una grande quantità di condizioni patologiche più o meno associate a danno renale. L'obiettivo di questa indagine scientifica è quello di valutare la pressione arteriosa e la proteinuria in cani affetti da diabete mellito (DM) ed iperadrenocorticism (o ipercortisolismo: HC), con particolare riferimento al rapporto urinario albumina/creatinina (U:A/C). In secondo luogo è stata eseguita una comparazione tra proteinuria e pressione arteriosa sistemica al fine di valutarne l'eventuale correlazione.

La proteinuria e la pressione arteriosa sono state anche correlate ai parametri sierici nei soggetti appartenenti alle popolazioni patologiche al fine di indagare l'eventuale ruolo di altri fattori, a parte la pressione arteriosa, nello sviluppo di una proteinuria patologica che di frequente si rileva nell'ambito delle disendocrinie esaminate.

1 PRESSIONE ARTERIOSA

1.1 Meccanismi omeostatici che regolano la pressione arteriosa

La pressione ematica rilevata in una particolare arteria definisce la pressione arteriosa (Pa) che è determinata, in primo luogo, dal volume di sangue immesso in circolo dal ventricolo sinistro (volume di eiezione) ed è influenzata da altri fattori quali la *compliance* arteriosa, la viscosità ematica e le resistenze periferiche. La Pa presenta valori diversi in relazione alle diverse fasi del ciclo cardiaco; si distingue, così, una pressione sistolica (Ps) o massima che riflette il valore della pressione arteriosa sistemica che corrisponde alla sistole ventricolare sinistra ed una pressione diastolica (Pd) o minima, corrispondente alla diastole ventricolare sinistra. La differenza tra Ps e Pd è detta pressione pulsatoria (Pp) o differenziale e rappresenta l'efflusso di sangue in aorta durante la sistole. La pressione media (Pm) rappresenta la media dei valori attraverso cui varia la pressione durante tutto il ciclo cardiaco. Poiché la sistole è più breve della diastole, la Pm è più strettamente dipendente dalla diastole ed il valore è approssimativamente ricavabile dalla seguente formula (Poggi et al., 2000):

$$Pm = Pd + \frac{(Ps - Pd)}{3}$$

La pressione sanguigna arteriosa sistemica (Pa o BP: *Blood Pressure*) è il prodotto della gittata cardiaca (CO: *Cardiac Output*) e della resistenza periferica totale (TPR: *Total Peripheral Resistance*); pertanto qualunque condizione che alteri CO e/o TPR è in grado di modificare la BP. CO dipende dalla frequenza cardiaca (sottoposta ad un controllo autonomo) e dalla gittata cardiaca determinata dalla forza inotropica del miocardio e dal

volume circolante intravascolare. TPR è la somma delle resistenze vascolari presenti in tutti i distretti vascolari dell'organismo (Henik, 1997).

La Pa è sottoposta a meccanismi nervosi riflessi che operano mediante *feed-back* negativo al fine di permettere solo lievi variazioni rispetto al valore normale. Il sistema che opera questo controllo è costituito da:

1.1.1 Barocettori

Sono stimolati dalle variazioni pulsatorie della Pa, ovvero dalle variazioni tensorie delle pareti vasali. I barocettori sono localizzati prevalentemente nelle pareti del seno carotideo e dell'arco aortico; inoltre, nelle arterie a livello sistemico, sono presenti recettori simili ai barocettori definiti "recettori a bassa pressione" in grado di evocare riflessi consensuali con i

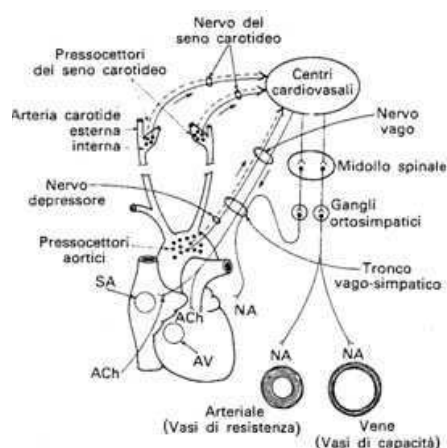


Figura 1: Effetti della stimolazione dei pressocettori delle pareti del seno carotideo e dell'arco aortico. Le fibre afferenti dei recettori (—— mieliniche o - - - - amieliniche) giungono fino ai centri cardiovasali. Variazioni della Pa determinano variazione della loro attività e conseguenti aggiustamenti della frequenza di scarica lungo i nervi vago ed ortosimpatico cardiaci e solo lungo l'ortosimpatico nei vasi ematici. Ach: acetilcolina; NA: noradrenalina; SA: nodo seno atriale; AV: nodo atrio-ventricolare (modificato da Rindi, 1990b)

riflessi barocettivi in modo da potenziarne il controllo sulla Pa. Sono localizzati negli atri e nelle pareti delle arterie polmonari. I barocettori aumentano o diminuiscono la frequenza di scarica in rapporto alle

variazioni pressorie; in caso di incremento della Pa essi aumentano la frequenza di scarica il che causa vasodilatazione (per inibizione del centro vasomotore del midollo allungato) e bradicardia (per stimolazione del centro cardioinibitore–nucleo motore dorsale del Vago) e conseguente diminuzione della pressione sanguigna e della gittata cardiaca. Nel cane la soglia dei barocettori aortici è posta a livelli più alti di Pa di quella dei recettori carotidei; pertanto i primi svolgono un ruolo antiipertensivo, mentre i secondi si attivano per contrastare l'ipotensione mediante tachicardia e vasocostrizione.

1.1.2 Chemocettori centrali e periferici

Sensibili alle variazioni della composizione chimica ematica quali il pH, la

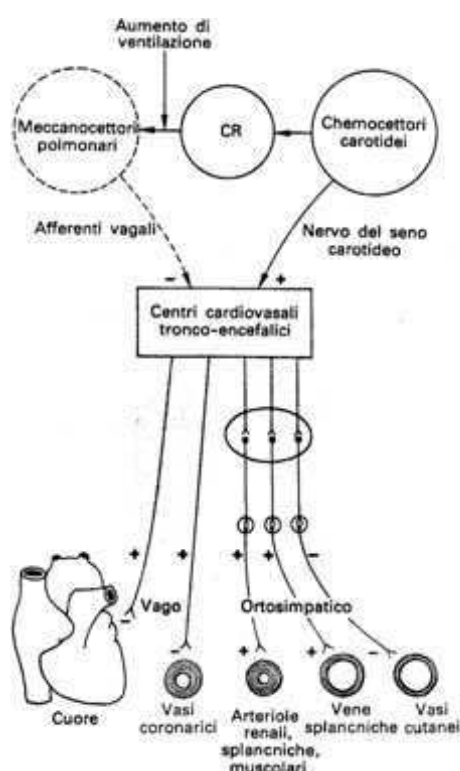


Figura 2: Effetti sui centri respiratori (CR) e cardiovascolari tronco-encefalici determinati dalla stimolazione dei chemocettori carotidei (modificato da Rindi, 1990b)

tensione parziale dell' O_2 (PO_2) e della CO_2 (PCO_2). I chemocettori periferici si trovano nei glomi localizzati a livello dell'arco aortico e della biforcazione delle carotidi. Svolgono un rilevante ruolo nella regolazione della respirazione, ma esercitano anche azione riflessa sulle regioni vasomotorie. I chemocettori centrali si localizzano a livello bulbare ed investono il ruolo principale nella regolazione della respirazione. Il ruolo principale dei chemocettori si svolge nei fenomeni ipotensivi. La diminuzione del flusso ematico e la riduzione della PO_2 , ma anche un aumento della PCO_2 ed una diminuzione del pH determinano un aumento di attivazione dei chemocettori che esita in una risposta ipertensiva e tachicardica che ripristina valori fisiologici di Pa o comunque li innalza a livelli che permettono una conseguente attivazione dei barocettori.

1.1.3 Centri cardiovasali

Localizzati in diverse zone del sistema nervoso (SN). Nel nucleo intermedio-laterale del tratto toraco-lombare del midollo spinale (MS) originano le fibre ortosimpatiche per cuore e sistema vascolare; nel nucleo intermedio-laterale del tratto sacrale del MS originano le fibre dilatatrici parasimpatiche; nel bulbo e nel ponte sono situati il centro cardioinibitore, posto nelle immediate vicinanze del nucleo motore dorsale del Vago ed il centro vasomotore.

Le fibre afferenti provenienti dai barocettori aortici e cardiaci e dai chemocettori dei glomi proiettano l'impulso lungo i rami del nervo Glossofaringeo (nervi seno-carotidei di Hering) e del nervo Vago (nervi cardio-aortici di Cyon-Ludwig) per raggiungere i centri cardiomotori e vasomotori, situati nel tronco encefalico (Poggi et al., 2000). Funzionalmente il centro vasomotore del tronco encefalico è costituito da una zona eccitatoria (area pressoria o vasocostrittrice) e da una zona inibitoria (area depressoria o vasodilatatrice). Quando aumenta il tono vasale costrittore si ha un aumento della costrizione arteriolare e

conseguente incremento della Pa. Contemporaneamente si ha vasocostrizione e aumento del volume diastolico e della gittata cardiaca. L'aumento del tono simpatico determina anche un aumento della

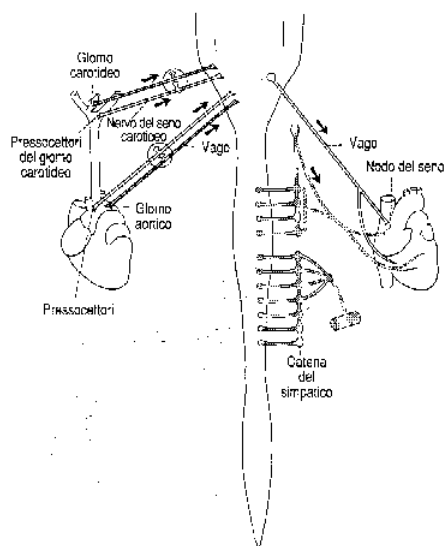


Figura 3: Sistema bulbare per il controllo della pressione ematica. I recettori sono a sinistra nella figura. I recettori per la pressione sono i pressocettori del seno carotideo e dell'arco aortico. I chemocettori (linee tratteggiate) sono i glomi carotideoi ed aortici. I recettori carotideoi mandano impulsi al SNC (sistema nervoso centrale) lungo il nervo di Hering (nervo del seno carotideo) che si unisce al glossofaringeo. Dai recettori aortici originano fibre afferenti che corrono nel vago (e nel nervo depressore). Gli effetti sono visualizzati a destra nella figura. Il nervo vago modifica la frequenza cardiaca attraverso la sua azione sul nodo seno atriale e potrebbe anche far variare la forza di contrazione cardiaca. Le fibre del simpatico innervano il nodo seno atriale e la muscolatura ventricolare. Inoltre innervano le arteriole della maggior parte degli organi. L'attivazione del simpatico determina un aumento della frequenza cardiaca, della contrattilità cardiaca e delle resistenze periferiche (modificato da Scher, 1995)

frequenza cardiaca e una diminuzione del tono del nervo Vago. Viceversa, una diminuzione della frequenza di scarica alle fibre vasocostrittrici causa vasodilatazione, caduta della Pa e vasodilatazione. In genere diminuisce anche la frequenza cardiaca, ma ciò è imputabile ad una stimolazione diretta del centro cardioinibitore. Le vie efferenti bulbari non comprendono vie efferenti ad azione inibitoria sulla muscolatura liscia

vasale; la caduta della pressione è dovuta, infatti, ad una diminuzione del tono vasocostrittore e ad una diminuzione della frequenza cardiaca.

1.1.4 Sistema Nervoso Autonomo (SNA)–Simpatico

L'attività del simpatico stimola la secrezione di catecolamine quali epinefrina e norepinefrina da parte della midollare delle surrenali che determinano aumento della frequenza cardiaca e vasocostrizione con conseguente aumento della Pa.

1.1.5 Ormone antidiuretico (ADH o vasopressina)

Prodotto dall'ipofisi in seguito ad ipotensione determina vasocostrizione e diminuita escrezione renale di acqua mediante alterazione della permeabilità dei tubuli collettori al fine di ripristinare la volemia (Poggi et al., 2000).

1.1.6 Sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA)

L'apparato juxtaglomerulare renale produce renina in seguito a stimoli di origine intrarenale e di natura nervosa. A livello renale gli stimoli in grado di causare produzione di renina sono una diminuzione della perfusione renale (diminuzione della pressione nell'arteria renale) e una diminuita concentrazione di sodio a livello intratubulare; gli stimoli di origine nervosa sono la stimolazione del simpatico e l'aumento in circolo delle catecolamine. La renina scinde l'angiotensinogeno in angiotensina I che a sua volta dà luogo all'angiotensina II grazie all'attivazione operata da un enzima di conversione (ACE: Angiotensin Converting Enzyme) a livello polmonare. Sul controllo della Pa il SRAA ha effetti sia a breve termine (attraverso la vasocostrizione) che a lungo termine (attraverso l'aumento del volume vascolare); infatti l'angiotensina II è un potente vasocostrittore arteriolare e, inoltre, stimola la secrezione di aldosterone da parte della corticale del surrene il quale causa ritenzione renale di sodio (Ross, 1999).

1.1.7 Fattore Natriuretico Atriale (Atrial Natriuretic Factor: ANF)

E' un ormone prodotto ed immagazzinato nei miociti atriali ed è rilasciato in circolo in risposta ad un aumento del riempimento atriale (Ross, 1999).

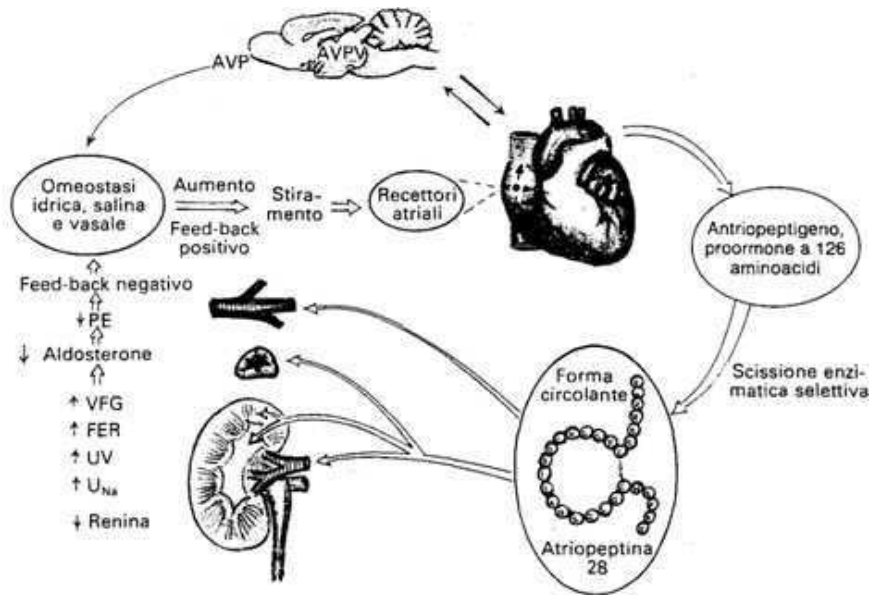


Figura 4: Schema del sistema ormonale atriopeptinico. UNA: escrezione renale di sodio; UV: volume urinario; FER: flusso ematico renale; VFG: velocità di filtrazione glomerulare; PE: pressione ematica; AVP: argininvasopressina; AVPV: regione anteroventrale periventricolare dell'ipotalamo (modificato da Rindi, 1990a).

Riduce la pressione ematica attraverso diversi meccanismi:

- Inibisce il riassorbimento tubulare del sodio, causando marcata natriuresi;
- Provoca un lieve aumento della velocità di filtrazione glomerulare (*Glomerular Filtration Rate*: GFR) senza incrementare il flusso ematico renale attraverso vasocostrizione dell'arteriola efferente e vasodilatazione dell'arteriola afferente;

- c. Inibisce il riassorbimento di sodio a livello del dotto collettore midollare con conseguente riduzione dell'ipertonicità midollare;
- d. Riduce la secrezione di renina;
- e. Agisce direttamente sulle cellule muscolari lisce dei vasi mediante inibizione della vasocostrizione operata dall'angiotensina II;
- f. A livello surrenalico inibisce la secrezione di aldosterone.

1.1.8 Prostaglandine:

Le prostaglandine prodotte dalla midollare renale (soprattutto la PGE₂) determinano vasodilatazione locale arteriosa; esse proteggono la funzione

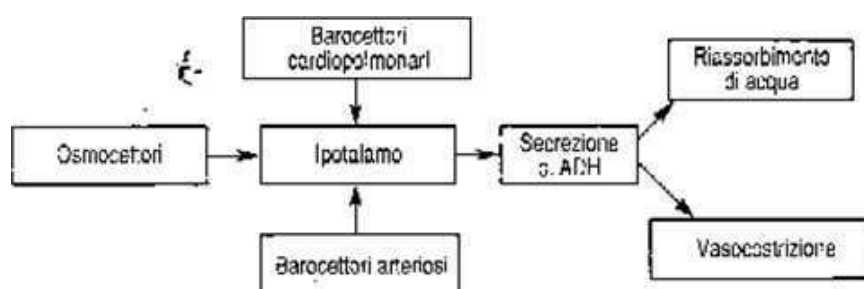


Figura 5: I recettori cardiopolmonari, i barocettori arteriosi e gli osmocettori mandano impulsi all'ipotalamo. La diminuita attività dei barocettori cardiopolmonari od arteriosi fa aumentare l'attività degli osmocettori e provoca l'escrezione di ormone antidiuretico (ADH). L'ADH causa riassorbimento di acqua e sodio e vasocostrizione (modificato da Scher, 1995a).

renale da eccessi di ormoni vasocostrittori e, perciò, da aumenti della pressione di perfusione. Inoltre inibiscono l'azione dell'ADH causando natriuresi (Poggi et al., 2000).

1.1.9 Chinine (callidina e bradichinina):

Hanno azione vasodilatatrice ed ipotensiva. A livello renale causano vasodilatazione, natriuresi e liberazione di prostaglandine;

1.1.10 Aldosterone:

Sintetizzato nella zona glomerulare della corticale delle ghiandole surrenaliche regola il riassorbimento del sodio a livello renale.

1.2 Metodiche indirette per il rilievo della Pressione Arteriosa nel cane

Negli animali d'affezione si considera la metodica diretta come la più accurata; è tuttavia poco pratica ed attuabile nella pratica clinica ambulatoriale e, tra l'altro, sconsigliata negli animali relativamente sani a causa dei potenziali rischi ad essa conseguenti. Se si esegue la misurazione della Pa mediante metodiche indirette, a prescindere dalla metodica prescelta, è necessario osservare alcune accortezze;

L'animale deve essere gestito con calma al fine di ridurre al minimo lo *stress* emozionale,

L'ambiente deve essere il più tranquillo possibile e possibilmente in presenza del proprietario;

Si deve rispettare un tempo di adattamento del paziente all'ambiente prima della procedura,

L'arteria oggetto di misurazione deve essere apprezzabile mediante palpazione digitale:

- Arteria tibiale craniale, sulla parte distale della faccia cranio-mediale della tibia;
- Arterie palmari superficiali a livello della regione metacarpale volare;
- Arteria coccigea sulla superficie ventrale della base della coda.

Le misurazioni indirette della Pa non sono invasive e meglio si adattano alla pratica clinica. Si ottengono applicando una cuffia (o manicotto) occludendo così un'arteria periferica (a livello di un arto o della coda), usando un trasduttore ultrasonico (metodo Doppler), oscillometrico o

fotopleetismografico distalmente al manicotto, al fine di individuare il flusso sanguigno o il movimento della parete arteriosa. L'ampiezza del manicotto sarà il 30-40% della circonferenza dell'arto (i manicotti grandi danno valori pressori falsamente più bassi, i manicotti piccoli aumentano la Pa) (Littman, 2002).

1.2.1 Doppler

La metodica indiretta Doppler è di facile uso, relativamente poco costosa e utilizzabile sia nel cane che nel gatto. Questo strumento rileva la pressione emettendo un'onda ultrasonica e, quindi, comparando la frequenza di quest'ultima ad un segnale che viene riflesso alla sonda (Acierno e Labato, 2005). Il movimento dei globuli rossi sottostante alla parete arteriosa determina uno "*shift*" di frequenza dell'onda ultrasonica che viene amplificato e si traduce in un suono udibile dall'operatore. Per questa metodica occorrono pochi strumenti, quali: rilevatore doppler, sfigmomanometro, gel per ultrasonologia, cuffie di adeguate dimensioni. La cuffia può essere applicata nella porzione prossimale di ogni estremità; la sonda doppler deve essere ricoperta da abbondante apposito gel e può essere applicata a livello di ogni arteria distale al manicotto. Per migliorare la conduzione delle onde, la parte dove viene applicata la sonda deve essere epilata e pulita con alcool. La cuffia deve essere insufflata 20-30 mmHg oltre il suono udibile, quindi gradualmente sgonfiata (1-3 mmHg/secondo) mentre l'operatore osserva il valore pressorio allo sfigmomanometro. Il punto in cui il flusso ematico diviene di nuovo udibile, rappresenta la pressione sistolica. Spesso è possibile apprezzare un ulteriore suono mano a mano che la cuffia si sgonfia; esso rappresenta la pressione diastolica. Tuttavia, mentre percepire il suono relativo alla pressione sistolica è semplice, per la pressione diastolica può non esserlo (Acierno e Labato, 2005). Nonostante ogni arteria nelle estremità distali

possa essere utilizzata, quelle maggiormente utilizzate sono: arteria tibiale craniale, arteria mediana, metacarpale e coccigea.

Il posizionamento del soggetto è condizionato dal temperamento; è da preferirsi il decubito laterale, tuttavia se il soggetto mal tollera il

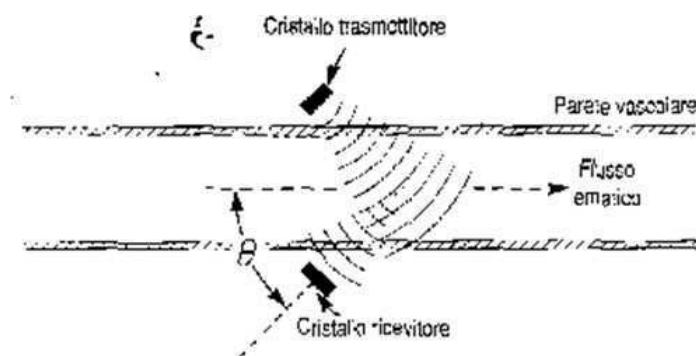


Figura 6: Doppler shift: il suono viene generato a livello del cristallo trasmittitore e viene riflesso dai globuli rossi del sangue verso il cristallo ricevitore. La frequenza sonora ricevuta aumenterà o diminuirà in funzione della velocità degli eritrociti (modificato da Scher, 1995b).

posizionamento, anche in sternale o eventualmente seduto può essere accettabile. (Elliot e Grauer, 2007).

1.2.2 Metodo Oscillometrico

La tecnica oscillometrica utilizza una cuffia che viene applicata a carico di un'estremità distalmente e insufflata in modo automatico fino alla mancata percezione di ogni suono. Lo strumento poi lentamente rilascia la cuffia mentre rileva le pulsazioni create dal flusso sanguigno arterioso in termini di movimenti della parete arteriosa. Questo strumento fornisce i valori di Pa sistolica, diastolica e media ed è accurata negli animali di media-grossa taglia. Questo strumento è totalmente automatico ed è pertanto di valido ausilio nel monitoraggio del paziente sottoposto ad anestesia. Nei cani di piccola taglia e nei gatti non è dotato di buona accuratezza poiché può facilmente sottostimare la Pa (Brown ed Henik,

1998). Inoltre è sensibile ai movimenti dell'arto e alle vibrazioni (Acierno e Labato, 2005).

E' necessario eseguire più misurazioni e calcolarne la media. Alcuni Autori suggeriscono di eseguire sette misurazioni con un intervallo di un minuto l'una dall'altra, di scartare poi quelle con valore sistolico più alto e più basso calcolando poi la media sulle altre cinque (Edwards, 1992).

Da un recente studio (Haberman et al., 2006), emerge una buona correlazione tra i valori di Pa rilevati mediante metodo diretto (radiotelemetria) e i valori ottenuti mediante l'impiego di due metodiche indirette (Doppler e Oscillometria). Dai risultati raggiunti si ammette che sia il metodo oscillometrico che Doppler, nonostante i risultati non soddisfino per precisione ed accuratezza i criteri AAMI (*Advancement of Medical Instrumentation*), le metodiche indirette siano con buona approssimazione sovrapponibili alla metodica diretta, soprattutto misurando la media di misurazioni seriali (in questo caso 5). Da questo studio, inoltre, risulta che la migliore correlazione si ottenga attraverso l'applicazione della cuffia nell'arteria coccigea (oscillometrico) e l'applicazione della sonda nell'arteria metatarsale (Doppler). Dalla comparazione di tre metodiche (diretta e indiretta mediante oscillometria e ultrasonologia Doppler) impiegate in clinica su 28 cani sani (Stepien et al, 1999) e in cui si considerava buona comparazione delle metodiche se i valori presentavano differenze ≤ 10 mmHg, è emerso che le due metodiche non sono esattamente sovrapponibili ai risultati ottenuti mediante valutazione diretta; tuttavia, SAP e MAP mediante oscillometria e la SAP mediante Doppler non mostravano differenze superiori a 10 mmHg. In questo studio, inoltre, l'età non influenzava la Pa, contrariamente a quanto si afferma in precedenti studi coinvolgenti un campione più numeroso (Bodey e Michell, 1996). In questo studio il grado di ansietà del soggetto, valutato soggettivamente, non appare avere influenza sulla Pa (Stepien e Rapoport, 1999).

1.3 L'ipertensione nel cane

Per diagnosticare e trattare l'ipertensione è necessario eseguire la misurazione della pressione arteriosa nella pratica clinica (Brown et al, 2007). La pressione arteriosa può essere misurata attraverso metodiche dirette (Gains et al, 1995; Meurs et al, 1996; Waddell, 2000) o attraverso metodiche indirette più comunemente attuabili nella pratica clinica (Bodey e Michell, 1996; Jacob et al, 2003; Meurs et al, 2000; Weiser et al, 1977).

Il monitoraggio del sistema cardiovascolare è essenziale nell'ambito della medicina d'urgenza; la misurazione diretta della Pa è più accurata sia nell'animale sveglio che anestetizzato ed è indicata soprattutto nel paziente critico che richiede un monitoraggio continuo (Meurs et al, 1996; Waddel, 2000). La metodica ideale prevede il posizionamento di un catetere arterioso che viene connesso ad un trasduttore di pressione e ad un monitor che permette di visualizzare pressione sistolica, diastolica e media in modo continuo. Il monitoraggio diretto e continuo della Pa è particolarmente utile in animali che devono essere sottoposti ad anestesia ed affetti da patologie rappresentanti fattori di rischio in ambito anestetico o in animali critici con gravi complicanze cardiovascolari. Il catetere arterioso viene comunemente posizionato in arteria metatarsale, ma anche in arteria femorale o auricolare dopo epilazione, lavaggio chirurgico e pulizia con alcool. Nel cane i valori riportati e considerati normali sono quanto mai vari a seconda degli Autori; secondo Waddel e colleghi, sono compresi, per la pressione arteriosa sistolica tra 110 e 190 mmHg e per la pressione arteriosa diastolica tra 55 e 110 mmHg. Si parla di ipotensione per pressione sistolica < a 80 mmHg e/o pressione media < 60 mmHg (Waddel, 2000). La metodica diretta di rilievo della Pa deve essere designata solo ai pazienti critici, mentre è da evitare nei pazienti relativamente sani a causa dei rischi connessi a tale metodica che includono eventuale comparsa di ematomi, infezioni, trombosi e necrosi

dei tessuti circostanti, nonché dolore nel soggetto non anestetizzato (Gains et al, 1995).

In uno studio (Bodey et al, 1994) è stata comparata una metodica indiretta oscillometrica alla misurazione diretta della Pa. Sono stati valutati 24 cani sottoposti ad anestesia generale e 8 non anestetizzati. In tutti gli animali esaminati sono state impiegate entrambe le metodiche, diversi posizionamenti dell'animale e diversi punti di applicazione della cuffia nel rilievo indiretto. Il catetere per la metodica diretta è stato posizionato in arteria metatarsale ricorrente. Per ogni metodica sono state eseguite dieci misurazioni dalle quali è stata calcolata la media. Dallo studio che ha comparato l'affinità tra misurazione diretta e indiretta è emersa una migliore correlazione tra le due mediante posizionamento della cuffia a livello della coda. Questo risultato è analogo a quanto emerso da uno studio precedente (Vincent et al, 1993). Inoltre si ritiene che il posizionamento del manicotto a livello della coda, necessitando di una minore contenzione, sia meglio tollerato e che quindi offra una buona riproducibilità soprattutto in animali non sottoposti ad anestesia. Per quanto riguarda l'applicazione della cuffia a livello degli arti, applicando la cuffia negli arti posteriori i risultati erano più concordi a quelli rilevati con la metodica diretta rispetto a quelli ottenuti applicandola nel bipede anteriore; ciò verosimilmente dipende dalla maggiore vicinanza dei due distretti di valutazione. L'applicazione della cuffia nella porzione prossimale degli arti posteriori dava i risultati più sovrapponibili al rilievo diretto, tuttavia, a fronte di una maggior tolleranza dell'animale che implica minor contenzione, l'applicazione nella parte distale dell'arto è forse da preferirsi, soprattutto negli animali consci. Un altro studio (Bodey et al, 1996) ha comparato le due metodiche sopra citate in cani non anestetizzati ponendoli in decubito laterale o in stazione e con diverso posizionamento della cuffia. Si assume che, necessariamente, i risultati ottenuti con metodica diretta o indiretta siano diversi; ciò può dipendere dalla diversa

arteria scelta, dal fatto che la metodica diretta rileva l'onda pressoria mentre l'indiretta misura gli effetti della stessa in termini di movimenti della parete arteriosa e, inoltre, dal fatto che la Pa è variabile e le misurazioni possono non avvenire simultaneamente. I risultati di questo studio sottolineano come la precisione della metodica indiretta possa essere nettamente maggiore se si eseguono misurazioni seriali dalle quali si calcola la media. Si raccomanda di eseguire una serie di 6–10 misurazioni, di eliminare dalla serie la prima e ogni valore che si allontana dal valore centale e di calcolare la media. La metodica raccomandata richiede circa 5–10 minuti per ogni misurazione seriale; l'esecuzione di misurazioni seriali e il rispetto del tempo di adattamento dell'animale consentono una maggiore sovrapposizione con la misurazione diretta. Da questo studio emerge una più reale stima della Pa se l'animale viene posizionato in decubito piuttosto che in stazione. Nel caso in cui si utilizzi un metodo indiretto per la Pa è necessario sottolineare alcuni aspetti:

- Sia nell'animale in decubito che in stazione, le differenze tra valori ottenuti mediante tecnica diretta o indiretta sono minimi, in particolare per la pressione arteriosa diastolica e media;
- La pressione sistolica è in genere sottostimata con l'impiego di tecnica indiretta sia in decubito che in stazione;
- La misurazione con posizionamento dell'animale in decubito laterale è più attendibile che nel cane in stazione, anche se, in alcuni casi, può essere difficile contenere l'animale evitando lo stress che ne deriva;
- Nel cane in stazione risultati attendibili si ottengono posizionando il manicotto nella coda o prossimalmente nell'arto anteriore (più difficile il posizionamento in quest'ultimo caso);
- Necessarie misurazioni seriali da cui si ricava il valore medio;
- La misurazione indiretta può sottostimare la pressione sistolica in misura tanto maggiore quanto più elevata è la Pa;

- Ad elevate frequenze cardiache, il metodo indiretto può sottostimare la Pa;

L'Autore consiglia, nell'animale non sedato, l'applicazione del manicotto a livello delle coda con animale in stazione e contenimento minimo (Bodey et al.,1996).

Anche in un altro studio (Gains et al, 1995) risulta una buona correlazione tra valori ottenuti mediante metodica diretta e indiretta in 11 cani sottoposti ad anestesia; in realtà emerge una tendenza a sottostimare la Pa diastolica e media nello stadio superficiale dell'anestesia e a sovrastimare la Pa sistolica nello stadio di anestesia profonda; tuttavia queste differenze potrebbero non avere alcun significato clinico. Si conclude perciò che la tecnica oscillometrica fornisce un'accurata stima della reale pressione arteriosa sistemica.

In uno studio che ha coinvolto 1903 cani sani e affetti da varie patologie (Bodey e Michell, 1996) la pressione arteriosa, misurata attraverso metodo oscillometrico, ha evidenziato come la maggiore variabile tra i soggetti sia la Pa sistolica. Essa è influenzabile da alcuni fattori tra cui, in primo luogo, l'età analogamente a quanto avviene nell'uomo. Altri fattori in grado di influenzare la Pa sistolica sono risultati essere, per gli animali sani, la razza e il sesso e, in minor misura, il temperamento, l'esercizio fisico e il regime dietetico. Per quanto concerne la Pa diastolica essa è influenzata da età, razza, temperamento, sesso e dieta. L'età è risultato essere il fattore maggiormente in grado di influenzare anche la Pa media, seguito dal temperamento, dal sesso, dalla razza e dall'esercizio fisico. Tra i cani sani, sono stati rilevati valori diversi in relazione alla razza; in particolare le razze da caccia mostravano valori nettamente più elevati rispetto ad altre. Anche i Greyhound mostravano più elevati valori pressori rispetto ad altre razze e ciò era vero sia nei soggetti da corsa che in quelli da compagnia; da ciò si può supporre che non sia la diversa attitudine o il grado di allenamento dei soggetti o almeno non solo questi ad influenzare i valori pressori della

razza. L'età e la razza, da questo lavoro, sembrano essere i maggiori fattori influenzanti tutti i parametri della pressione arteriosa negli animali sani.

In uno studio (Remillard et al, 1991) è stata effettuata un'indagine che si poneva due obiettivi: uno era quello di valutare eventuali differenze tra la Pa misurata in ambiente familiare (casa) e in clinica, l'altro quello di estrapolare i valori medi di pressione arteriosa sistolica (Systolic Arterial Pressure: SAP) e pressione arteriosa diastolica (Diastolic Arterial Pressure: DAP) in una popolazione costituita da 102 cani clinicamente sani. SAP e DAP non mostravano differenze significative tra i valori ottenuti a casa o in clinica; i soggetti mostravano unicamente un aumento statisticamente significativo nella frequenza cardiaca che è maggiormente influenzabile dal temperamento (Remillard et al, 1991; Bodey e Michell, 1996). I risultati ottenuti mostrano una buona correlazione tra ultrasonografia doppler e metodica di rilievo diretta in accordo con precedenti studi (Weiser et al, 1977). Sono stati giudicati ipertesi i soggetti che presentavano valori > 2 deviazioni standard (SD) rispetto ai valori medi e quindi quelli che mostravano valori di SAP e DAP rispettivamente > 202 mmHg e > 116 mmHg (10% sulla popolazione totale di animali clinicamente sani).

In uno studio più recente (Kallet et al, 1997) 14 cani clinicamente sani sono stati sottoposti a misurazione della Pa mediante oscillometria attraverso misurazioni seriali effettuate in un primo momento a casa e poi in clinica. In entrambi gli ambienti le misurazioni sono state fatte applicando il manicotto sia a livello metacarpale che a livello metatarsale in associazione alla valutazione seriale della frequenza cardiaca. L'obiettivo era quello di stabilire se, anche il cane, possa essere affetto, analogamente a quanto può avvenire nell'uomo, alla cosiddetta "ipertensione da camice bianco" indotta da fattori emozionali evocati dalle circostanze. In questo studio i cani esaminati sono stati posti in decubito laterale con minima contenzione ed utilizzando cuffie con altezza pari al 40% della circonferenza dell'arto nel punto di applicazione della stessa come raccomandato da studi precedenti

(Valtonen e Eriksson, 1970). In questa indagine, la Pa e la frequenza cardiaca ottenute dal metacarpo e dal metatarso in ambiente familiare erano significativamente più basse rispetto alla pressione e alla frequenza cardiaca valutate dal metatarso in clinica. Analogamente, un aumento della Pa, ma non della frequenza cardiaca, era stato rilevato da uno studio precedente in cui si era impiegata una metodica analoga (Vincent et al, 1993), mentre questi dati discordano con lo studio sopra citato (Remillard et al, 1991). Questa discordanza potrebbe essere in relazione alla diversa metodica impiegata per la misurazione della Pa o all'ordine di esecuzione delle misurazioni. Sulla base di uno studio effettuato su un cospicuo numero di cani sani (Bodey e Michell, 1996) che considera ipertesi soggetti con frequenza cardiaca/minuto < 120 pulsazioni/min e con SAP e DAP rispettivamente > 150 mmHg e > 90 mmHg, nessuno dei cani esaminati in questo studio era iperteso a casa, mentre in clinica 5/14 (36%) presentavano ipertensione durante le prime misurazioni e 2/14 (14%) anche alle successive. Si conclude che i valori maggiori di Pa ottenuti a livello metatarsale in clinica dallo studio sopra citato (Kallet et al., 1997) possano essere in relazione all'adattamento del soggetto all'ambiente circostante piuttosto che a reali differenze nella Pa a questo livello; questi risultati confermano la necessità di misurazioni seriali nel rispetto di un adeguato tempo di adattamento dell'animale al fine di evitare false diagnosi di ipertensione.

Pochi sono gli studi atti al monitoraggio della pressione arteriosa nei cani sani e quindi alle variabili che la influenzano. In uno studio su 7 cani sani, la Pa è stata monitorata nelle 24 ore (Mishina et al, 1999) mediante inserimento di un catetere in arteria femorale (metodica diretta) in anestesia. Da questa analisi la Pa presentava valori più elevati nel giorno di applicazione del catetere e il giorno seguente; la pressione tendeva poi a stabilizzarsi nel giro di 5-7 giorni. Tutti i valori pressori erano più elevati durante il giorno in concomitanza con l'esercizio fisico, mentre durante il

riposo notturno presentavano i valori più bassi. Ciò è analogo a quanto si osserva nell'uomo in cui la pressione è influenzata sia dal ritmo circadiano, ma anche dalle attitudini e dal movimento; infatti, nelle persone che svolgono lavoro notturno si rilevano maggiori valori pressori nella notte.

Da uno studio (Weiser et al, 1977) che ha comparato metodica diretta e indiretta, quest'ultima rilevata attraverso ultrasonologia Doppler, è emersa una buona correlazione tra le due metodiche. Inoltre, i risultati ottenuti mediante metodo indiretto erano simili e non influenzati in modo significativo anche modificando il posizionamento del soggetto.

L'ipertensione sistemica è piuttosto comune nel cane ma, contrariamente a quanto avviene nell'uomo, in cui l'ipertensione primaria o "essenziale" è comune, nel cane è soprattutto conseguente a patologie (ipertensione secondaria) quali nefropatie, iperadrenocorticismo (Ortega et al., 1996; Goy-Thollot et al., 2002), diabete mellito (Struble et al., 1998), feocromocitoma (Gilson et al., 1994), iperaldosteronismo e ipotiroidismo. Sia nell'uomo che nel cane la manualità e l'ambiente circostante sono in grado di causare un aumento della Pa emozionale (c.d. "effetto da camice bianco-white coat effect") che, in genere, scompare o si attenua nell'arco di qualche minuto. Per questo motivo si raccomanda un periodo di adattamento di 5-10 minuti al fine di evitare una falsa diagnosi di ipertensione. In 12 cani sani è stato indagato l'effetto emozionale sulla Pa e il tempo di adattamento alla manualità attraverso misurazione seriale della Pa effettuata fino a 161 giorni (Shellenberg et al, 2007). In questo studio sono state impiegate due metodiche indirette: oscillometrica e doppler. Le due metodiche hanno mostrato una buona correlazione negli animali normotesi, mentre in cani tendenzialmente ipertesi o ipotesi si osservava minor comparazione; si sottolinea però come il rilievo attraverso le due metodiche non fosse simultaneo; pertanto è possibile che le differenze fossero reali e in relazione al momento di rilievo della stessa piuttosto che alla metodica impiegata. Alla prima misurazione 8/12 soggetti

presentavano SAP > 160 mmHg, solo un soggetto alla seconda/terza e nessun cane alle seguenti misurazioni mostrava ipertensione; questi risultati confermano l'esigenza di misurazioni seriali e di un adeguato adattamento del paziente alla manualità. Anche qui i soggetti di sesso maschile mostravano Pa più elevata della femmine, in accordo con precedenti studi (Body e Michell, 1996). Non se ne conosce il motivo, ma si suppone che dipenda da un differente temperamento e da una differente sensibilità allo *stress*. Nell'uomo la Pa tende ad aumentare con l'età; l'ipertensione sistemica si osserva prevalentemente nel soggetto anziano in cui la *compliance* arteriosa tende a diminuire a causa di una progressiva diminuzione dell'elasticità e della capacità delle arterie. Da uno studio che ha confrontato la Pa mediante oscillometria in cani sani anziani e non (Meurs et al, 2000), non è emersa una significativa differenza di Pa in relazione all'età. Questo risultato può essere assunto come la conferma del fatto che, nel cane l'ipertensione "essenziale" o primaria, sia pur riscontrata (Littman et al, 1988; Bovee et al, 1989) sia rara mentre più frequentemente l'ipertensione è secondaria ad altre patologie. In questo studio, però, i campioni esaminati erano numericamente piuttosto bassi (33 anziani e 22 cani di controllo), inoltre sono stati esclusi gli animali obesi. Da studi precedenti è emersa una correlazione positiva tra obesità e ipertensione sia in Medicina Umana che in Medicina Veterinaria, ad eziologia probabilmente multifattoriale. Un aspetto interessante è che la DAP e la MAP erano significativamente più elevate nel gruppo di controllo (giovani); ciò potrebbe essere giustificato dalla presenza, nel gruppo geriatrico, di soggetti con minore elasticità e tono vasale in grado di ridurre la capacità di mantenere la DAP. Tuttavia è anche possibile che queste differenze siano attribuibili a differenze di taglia e sesso dei soggetti appartenenti ai due gruppi. Gli effetti della taglia del soggetto sulla Pa non sono ancora ben noti; tuttavia una relazione inversa tra taglia e Pa è emersa da uno studio precedente (Bodey e Michell, 1996) e nel gruppo dei

cani anziani era presente una maggiore percentuale di soggetti di taglia maggiore e, quindi, con possibili valori fisiologicamente più bassi rispetto ai soggetti di piccola taglia. Tra i cani anziani, inoltre, era presente una percentuale maggiore di maschi rispetto al controllo; i risultati emersi discordano con uno studio precedente in cui i maschi presentavano Pa tendenzialmente più elevata delle femmine (Bodey e Michell, 1996). Infine, la SAP non era significativamente diversa tra cani anziani e giovani, ma è necessario sottolineare l'esiguo numero dei soggetti considerati; è possibile che un eventuale aumento numerico dei soggetti possa dare diversi risultati. In precedenza è stato infatti dimostrato (Bodey e Michell, 1996) che la SAP sia il parametro pressorio più facilmente influenzabile da fattori quali razza, sesso, età e temperamento e da questo studio epidemiologico su un campione numeroso di soggetti i valori di SAP, DAP e MAP erano più elevati negli animali più anziani; tuttavia, non essendo state eseguite approfondite indagini atte a diagnosticare eventuali patologie a decorso cronico e asintomatiche almeno nelle fasi iniziali, è possibile che i soggetti più anziani ne fossero affetti e che la tendenza all'ipertensione fosse secondaria a queste eventuali patologie. Numerosi studi hanno impiegato metodiche indirette per il rilievo della Pa, ma in uno in particolare (Stepien et al, 2003) l'obiettivo era quello di definire la capacità delle metodiche indirette di discriminare tra soggetti normotesi e soggetti ipertesi al fine di valutare la reale esigenza di sottoporre questi ultimi a terapia. I risultati ottenuti mostrano una buona correlazione tra metodiche indirette e diretta con buona sensibilità (Se) e specificità (Sp) delle metodiche analizzate nel riconoscere soggetti con SBP \geq 160 mmHg.

L'ipertensione viene definita come un aumento della pressione sanguigna sistemica, diastolica o sistolica, al di sopra dei valori considerati normali per la specie in esame. Il Comitato nazionale per il rilevamento, lo studio ed il trattamento dell'ipertensione (*Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure*) afferma che lo stato di

ipertensione, nell'uomo, può essere confermato quando il valore medio di più misurazioni della pressione diastolica, determinato almeno in due visite consecutive, è \geq a 90 mmHg.

L'organizzazione Mondiale della Sanità definisce lo stato di ipertensione come l'esistenza di una pressione sistolica $>$ a 160 mmHg ed una pressione diastolica superiore a 95 mmHg (Edwards, 1992). Secondo le definizioni basate su indagini statistiche, deve essere considerato segno di ipertensione il riscontro di valori superiori a due (2) deviazioni standard al di sopra dei valori normali, sia per la pressione sistolica che per la pressione diastolica. Oltre alle difficoltà connesse alla definizione dell'ipertensione, si aggiungono fattori esterni, principalmente emozionali e legati allo *stress* che accompagna la procedura di misurazione e ciò è ancor più vero in Medicina Veterinaria.

La popolazione canina è quanto mai eterogenea e la razza, insieme all'età, rappresenta la maggiore variabile in seno alla popolazione canina. Alcune razze (Bodey e Michell, 1996), in particolare le razze da caccia (sight hound) (in particolare il Levriero Scozzese), mostravano valori pressori al limite superiore considerato fisiologico nell'uomo. Al contrario, i Labrador e Golden Retriever, erano tendenzialmente ipotensi comparando i loro valori pressori a quelli dell'uomo. In uno studio il cui obiettivo era valutare la Pa in diverse razze e mettere in relazione i dati alla viscosità ematica ed al valore ematocrito (Bodey e Rampling, 1999) è emersa una differenza significativa ($p < 0.001$) tra cani da caccia (Pa più elevata), Retriever (Pa più bassa) e cani di diverse razze (Pa intermedia). In questo studio i cani che mostravano più elevati livelli di Pa (sight hound) presentavano anche valori più elevati di ematocrito e di viscosità ematica comparati ai soggetti con Pa più bassa (Retriever). Ciò potrebbe essere imputabile alla diversa attitudine delle razze esaminate. Al fine di stabilire un *reference range* di razza, è stato condotto uno studio su 158 cani sani di razza Irish Wolfhounds (Bright e Dentino, 2002). La scelta della razza è stata motivata anche

dall'importanza che riveste la Pa in una razza predisposta a diverse patologie cardiache. Questa indagine conferma ancora una volta la diretta correlazione età e Pa, che si presentava più elevata (SAP, DAP e MAP) nei soggetti più maturi. Per quanto riguarda il posizionamento del cane, solo la DAP mostrava valori significativamente più bassi negli animali in stazione rispetto a quelli in decubito laterale, anche se probabilmente questa differenza non aveva rilevanza clinica. La MAP e la SAP non erano differenti in modo significativo. La SAP era significativamente più elevata nei maschi rispetto alle femmine, mentre DAP e la MAP non lo erano. Anche il grado di ansietà del soggetto influenzava tutti e tre i parametri pressori. Contrariamente ad uno studio precedente (Bodey e Rampling, 1999) che afferma come i sight hounds abbiano valori pressori tendenzialmente più alti rispetto ad altre razze, da questo studio emerge che l'Irish Wolfhound, sia pur appartenente ai sight hound, presenta pressione arteriosa più bassa di altri sight hound e di altre razze di grossa taglia.

L'età sembra causare un aumento lieve (1-3 mmHg/anno) della Pa (Bodey e Michell, 1996; Bright e Dentino, 2002) anche se alcuni studi sono in disaccordo (Remillard et al, 1991; Meurs et al, 2000). La Pa, secondo alcuni, è lievemente più elevata nei maschi rispetto alle femmine (Bodey e Michell, 1996). Inoltre, le diverse razze presentano valori pressori evidentemente diversi; i sight hound (es. Greyhounds e Deerhound: Levriero Scozzese a pelo ruvido) presentano valori maggiori di circa 10-20 mmHg rispetto ad altre razze (Bodey e Michell, 1996; Bright e Dentino, 2002). Per quanto riguarda l'influenza del peso corporeo sulla Pa, un lieve (< 5 mmHg) aumento è stato osservato nei cani obesi misurando la pressione mediante oscillometria (Bodey e Michell, 1996), mentre mediante Doppler no (Remillard et al, 1991).

Il termine ipertensione primaria o essenziale, indica uno stato ipertensivo in assenza di cause predisponenti; ciò è di frequente riscontro in medicina umana (94% degli ipertesi) ed è stata riportata anche nel cane (Bovee et al,

1989). Tuttavia, la diagnosi di ipertensione primaria o essenziale è complicata dal fatto che, sia nell'uomo che negli animali è possibile che esistano patologie renali subcliniche alla base della stessa (Brown et al, 2007). La diagnosi di ipertensione idiopatica si raggiunge escludendo la presenza di malattie sottostanti e, quindi, in presenza di esame emocromocitometrico, biochimico e urinario nella norma nel paziente iperteso. Sfortunatamente, un incremento della Pa è in grado di causare poliuria (c.d. "natriuresi pressoria"), pertanto il rilievo di urine con basso peso specifico (< 1.030) in un paziente con elevata Pa non permette di stabilire se sia o meno presente una disfunzione renale. Al contrario, urine concentrate (> 1.030) rendono meno probabile la presenza di una patologia renale (Brown et al, 2007).

Nel cane, l'incidenza dell'ipertensione primaria è bassa ($< 1\%$), mentre più comunemente è secondaria ad altre patologie (Bodey e Michell, 1996).

Nell'uomo l'ipertensione si associa a numerosi segni clinici quali mal di testa, difficoltà di movimento, debolezza, carenza di energie, impossibilità all'esercizio fisico, "consapevolezza" cardiaca, vertigini, nervosismo, disturbi del sonno ed algia toracica (Polzin et al., 2002). Nei nostri animali le manifestazioni cliniche legate all'ipertensione sono soprattutto riferibili a danni d'organo (Poggi et al., 2000). Sono l'ischemia, da diminuita perfusione tissutale e le emorragie conseguenti alle lesioni indotte dall'ipertensione a determinare danno agli organi. Gli organi che particolarmente risentono dell'ipertensione sistemica sono l'occhio, il sistema nervoso centrale (SNC), il rene ed il sistema cardiovascolare (Polzin et al., 2002).

A carico del rene l'aumento della Pa causa una diminuzione della funzionalità renale, proteinuria fino all'insufficienza renale. In Medicina Umana la microalbuminuria rappresenta un *marker* precoce di danno renale ed un ausilio nel monitoraggio del paziente affetto da

ipertensione/nefropatia; anche nel cane, l'entità della proteinuria risulta essere direttamente proporzionale al grado di diminuzione della filtrazione glomerulare renale (Glomerular Filtration Rate – GFR) (Finco, 2004). Nel caso di preesistente iperazotemia, la possibilità di andare incontro a danno organico (*target-organ damage*: TOD) aumenta sensibilmente se la Pa sistolica è > 160 mmHg nel cane e nel gatto (Brown et al., 2000; Finco, 2004). L'ipertensione può essere presente ad ogni stadio della patologia renale cronica e il livello di creatinina sierica non è direttamente proporzionale all'entità dell'ipertensione (Kobayashi et al., 1990). Studi effettuati al fine di svelare la correlazione nefropatia/ipertensione nel cane hanno dimostrato che il 50-93% (Bartges et al., 1996) dei cani affetti da patologia renale sono ipertesi. Nefropatia cronica ed ipertensione spesso coesistono e la presenza di ipertensione all'esordio della patologia renale rappresenta un fattore di rischio di comparsa di insufficienza renale e morte (Jacob et al., 2003). Dai risultati ottenuti da questo studio, infatti, emerge una significativa più precoce comparsa di sindrome uremica e un più elevato rischio di mortalità nei soggetti affetti da nefropatia in cui la Pa, misurata mediante oscillometria, presentava valori compresi tra 161 e 201 mmHg. Pertanto, analogamente a quanto avviene nell'uomo, il mancato controllo dell'ipertensione si traduce in una progressiva e irreversibile insufficienza renale poiché il rischio di sindrome uremica aumenta di 1,4 volte per ogni aumento di pressione di 20 mmHg (Jacob et al., 2003). Il meccanismo eziopatogenetico alla base della disfunzionalità renale indotta dall'ipertensione è la sclerosi del glomerulo che comporta una progressiva perdita di nefroni funzionanti (Dukes, 1992). Le alterazioni istologiche renali che si associano ad ipertensione comprendono: glomerulosclerosi, atrofia glomerulare, glomerulopatia proliferativa e necrosi fibrinoide con progressiva perdita di parenchima (Henik, 1997). L'ipertrofia ventricolare sinistra rappresenta una conseguenza dell'ipertensione cronica e, il protrarsi dell'ipertensione può portare ad insufficienza mitralica e, quindi,

cardiaca (Littman et al., 1988). In caso di grave e protratta ipertensione si

	NORMALE	IPERTENSIONE	METODO
Littman MP (1995)	180/100		
Bodey AR (1996)	133/75		Oscillometrico
Duke J. (1992)	180/100		
Coulter DB (1984)	144 ± 27/91 ± 20		Oscillometrico
Ross LA (1992)	160/90		
Edwaeds N (1990)	138/89		
Weiser MG (1977)	155 ± 27		Diretto
Weiser MG (1977)	155 ± 26		Oscillometrico
Cowgill LD (1986)	148 ± 16/87 ± 8	> 180/95	Diretto
Kittleson MD	180	> 180	Diretto
Edwards NJ (1992)	91/156		
Stepien (1999)	154 ± 20/84 ± 9		Diretto
Stepien (1999)	151 ± 27		Doppler
Stepien (1999)	150 ± 20/71 ± 18		Oscillometrico

Tabella 1: Valori pressori normali e patologici nel cane; modificata da Poggi et al., 2000.

possono osservare anche segni neurologici conseguenti a dilatazione vascolare ed emorragie quali: depressione, convulsioni, *deficit* neurologici, disorientamento, *circling*, fino al coma (Gwin et al., 1978; Patterson et al., 1985).

Organo	Anomalie tipiche
Occhio	Emorragie retina Soffusioni retina Ifema Tortuosità vasi
Sistema nervoso	Alterazioni comportamento/appetito Evidenza di lesione intracranica Depressione/crisi convulsive
Rene	↓capacità concentrazione urine Proteinuria patologica
Altro	Epistassi

Tabella 2: Alcuni tra i segni clinici tipicamente associati ad ipertensione sistemica (modificata da Elliot e Grauer, 2007)

Nell'uomo, l'ipertensione frequentemente causa alterazioni retiniche, riportate anche nel cane (Gwin et al., 1978; Littman et al., 1988; Jacob et al., 2003). L'ipertensione esita in vasocostrizione reattiva delle arteriole

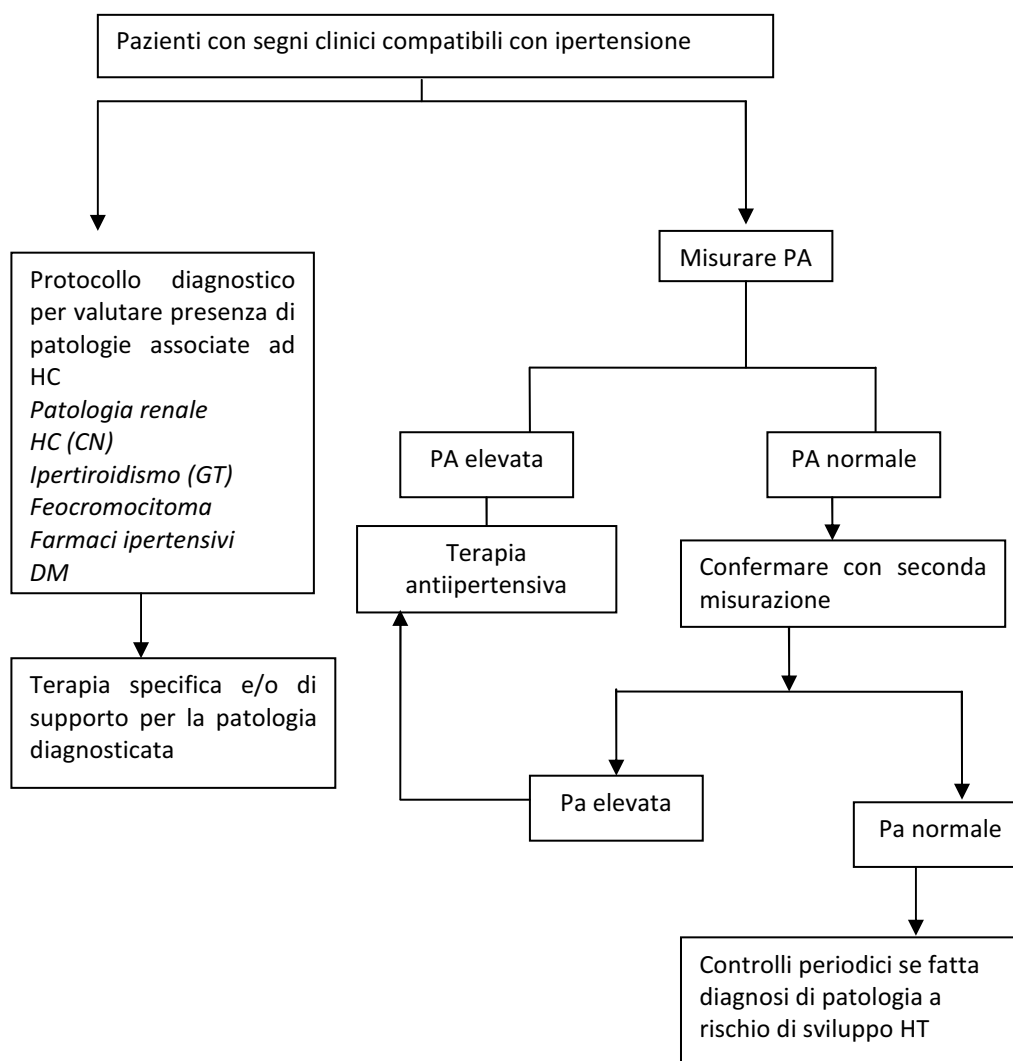


Figura 7: Suggerimenti da seguire in caso di sospetto di ipertensione arteriosa (HC: ipercortisolismo; HT: ipertensione (Hypertension); DM diabete mellito; PA pressione arteriosa (modificato da Elliot e Grauer, 2007).

retiniche con conseguente ischemia che esita in necrosi e dilatazione del tessuto muscolare vascolare (Paulsen et al., 1989). Le manifestazioni cliniche sono evidenza di tortuosità dei vasi retinici, fino alla comparsa di glaucoma, emorragie intraoculari, distacco retinico.

1.4 Diabete mellito

Il pancreas endocrino è costituito dalle isole di Langerhans nelle quali, sulla base delle diverse caratteristiche morfologiche e tintoriali, si distinguono 4 popolazioni cellulari:

- Cellule alfa: secernono glucagone
- Cellule beta: secernono insulina
- Cellule delta: secernono somatostatina
- Cellule F: secernono il polipeptide pancreatico

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (1980) il diabete mellito è "uno stato di iperglicemia cronica causata da fattori genetici ed esogeni che agiscono spesso congiuntamente".

In Medicina Umana il DM viene classificato in base all'eziopatogenesi in tipo I e tipo II; il tipo I è caratterizzato da distruzione immunologica delle cellule beta pancreatiche e conseguente insulionopenia (Eisenbarth, 1986; Palmer e McCulloch, 1991) ed è il c.d. "diabete giovanile". Il tipo II è caratterizzato da insulino-resistenza periferica e da disfunzionalità delle cellule beta (Reaven, 1988; Leathy, 1990) ed è il c.d. "diabete senile".

Il diabete mellito (DM), nel cane e nel gatto, è un disturbo della porzione endocrina del pancreas dovuto ad una deficienza, assoluta o relativa, della sintesi di insulina da parte delle cellule beta.

In base all'eziopatogenesi si distinguono due forme di DM (Hoenig , 1995; Feldman e Nelson, 2004):

- Diabete Mellito di tipo I o insulino-dipendente (*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: IDDM*) caratterizzato da una progressiva distruzione e perdita delle cellule beta;
- Diabete Mellito di tipo II o non insulino-dipendente (*Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: NIDDM*) caratterizzato da fenomeni di insulino-resistenza e da un'insufficienza funzionale e relativa delle cellule beta pancreatiche.

- Diabete Mellito secondario, documentato sia nel cane che nel gatto e caratterizzato da intolleranza ai carboidrati indotta da una patologia che antagonizza l'insulina o da un eccesso di progesterone, come si verifica fisiologicamente nella cagna nella fase diestrane che segue al calore o nella gatta a seguito di somministrazione di megestrolo acetato.

1.4.1 IDDM

Nel cane la forma più frequente, se non l'unica, è il diabete mellito insulino-dipendente (IDDM). L'eziologia è multifattoriale (Feldman e Nelson, 2004) e sicuramente la predisposizione genetica ha un ruolo rilevante (Hess et al. 2000; Kimmel et al., 2002). Esistono rarissimi casi di agenesia congenita delle cellule beta (Kramer et al., 1980) e da uno studio (Alejandro et al., 1988) effettuato mediante esame istologico pancreatico post-mortem su cani affetti da DM è emerso che il 35% dei soggetti presentava segni compatibili con esiti di pancreatite cronica. E' possibile che alterazioni croniche e non sintomatiche a carico delle isole pancreatiche e delle cellule beta possano predisporre il cane adulto a sviluppare la disendocrinia congiuntamente a fattori diabetogeni quali, ad esempio, infezioni, patologie varie, farmaci ad azione insulino-antagonista, obesità, pancreatite. La pancreatite potrebbe rappresentare un fattore predisponente la distruzione della porzione endocrina (Ling et al., 1977; Alejandro et al., 1988); tuttavia, nel DM del cane, è coinvolto probabilmente un insieme di più fattori genetici e non (Feldman e Nelson, 2004). Nell'uomo la comparsa di IDDM è legata a reazioni autoimmuni che esitano nella progressiva distruzione degli isolotti pancreatici; nell'uomo affetto da IDDM oltre il 50% della popolazione presenta anticorpi della classe IgG diretti contro le cellule beta del pancreas (Feldman e Nelson, 2004). Analoghi anticorpi sono stati individuati nel siero di alcuni cani diabetici (Haines e Penhale, 1985; Hoenig e Dawe, 1992). Appare quindi

verosimile che anche nel cane si possano sviluppare reazioni autoimmuni che, associati ad altri fattori, siano responsabili della comparsa della patologia (Feldman e Nelson, 2004).

1.4.2 NIDDM

Nell'uomo definito "diabete senile" ed associato ad insulino-resistenza e disfunzionalità delle cellule beta correlata all'obesità. L'intolleranza ai carboidrati legata all'obesità è documentata nel cane (Mattheeuws et al., 1984) e in alcuni cani affetti da DM è stata rilevata la presenza di amiloidosi pancreatica (Feldman e Nelson, 2004); tuttavia nel cane il NIDDM è estremamente raro.

1.4.3 Segnalamento ed Eziopatogenesi

Il DM viene, in genere, diagnosticato in animali di età compresa tra 4 e 14 anni, con una maggiore prevalenza tra 7-10 anni (Goy-Thollot et al., 1994; Feldman e Nelson, 2004). Il c.d. "diabete giovanile" si manifesta in soggetti con età < 1 anno, ma nel cane è estremamente raro (Feldman e Nelson, 2004).

L'incidenza è circa due volte maggiore nelle femmine rispetto ai maschi nella specie canina; nel gatto avviene il contrario, ovvero i maschi castrati hanno 1.5 volte maggior rischio di sviluppare la patologia rispetto alle femmine (Plotnik e Greco, 1995).

La predisposizione genetica, sia di razza che familiare, sembra giocare un ruolo, anche nel cane, nell'instaurarsi della disendocrinia (Hess et al., 2000). Sono state effettuate ricerche in seno alle diverse razze canine; i Pulik, Cairn Terrier, i Pinscher nani risultano molto più a rischio rispetto ad altre razze (Feldman e Nelson, 2004), ma anche Schnautzer nano, Bassotto Tedesco, Beagles, Barboncini (Plotnik e Greco, 1995; Greco, 2001). Il DM familiare è stato descritto nel Keeshonds, Golden Retriever, Barboncino nano, Samoiedo (Gershwin, 1975; Kramer et al., 1980). Nel Keeshonds,

incluso nelle razze a rischio, secondo alcuni studi sarebbe responsabile un gene autosomico recessivo nella trasmissione della patologia; in uno studio su cuccioli di questa razza all'esame istologico eseguito dopo eutanasia appariva assenza di isole di Langerhans, presenza di cellule alfa e presenza di cellule beta isolate (Kramer et al., 1980). I Samoiedo sono stati giudicati 12 volte maggiormente a rischio rispetto ai meticci (Hess et al., 2000). In questa razza è documentata anche la predisposizione familiare (Hess et al., 2000; Kimmel et al., 2002) anche se non è stata ancora svelata la specifica causa genetica. Il riscontro della familiarità nella trasmissione della patologia non è necessariamente legata alla predisposizione razziale; infatti, ad esempio, nel Golden Retriever, considerata razza a basso rischio, il diabete mellito familiare è documentato (Hess et al., 2000). Ovviamente lo studio statistico della predisposizione razziale è condizionato anche dalla distribuzione delle diverse razze nei diversi territori mondiali; in Italia (Fracassi et al., 2004) le razze a maggior rischio sono i Setter Irlandesi, i Barboncini, gli Yorkshire Terrier e i Setter Inglesi.

Razze considerate a rischio inferiore sono considerate essere il Pastore Tedesco (Marmor et al., 1992; Hess et al., 2000; Fracassi et al., 2004), il Boxer (Marmor et al., 1992; Fracassi et al., 2004), il Dobermann (Fracassi et al., 2004), il Cocker Spaniel, il Collie, il Pechinese, il Rottweiler; ciò potrebbe essere in relazione ad una particolare resistenza genetica alla patologia diabetica o ai suoi fattori predisponenti (Feldman e Nelson, 2004).

1.4.4 Rilievi Clinici

I sintomi associati a questa disendocrinia comprendono i quattro sintomi cardinali quali poliuria, polidipsia, polifagia e dimagrimento. La carenza di insulina determina un minor utilizzo di glucosio, amminoacidi e acidi grassi e un aumento della glicogenolisi e della gluconeogenesi con conseguente iperglicemia. Quando poi l'iperglicemia supera le capacità di riassorbimento di glucosio da parte delle cellule tubulari renali si verifica

glicosuria (nel cane quando la glicemia supera i 180 – 220 mg/dl) con conseguente poliuria (PU) e polidipsia (PD) compensatoria. La polifagia (PF) dipende dal fatto che il glucosio entra nel centro della sazietà solo in presenza di insulina; in corso di ipoinsulinemia il glucosio non è in grado di attivare il centro della sazietà e, quindi, di inibire il centro della fame. La perdita di peso consegue, da un lato, alla ridotta capacità di utilizzo del glucosio da parte dei tessuti periferici e dalla perdita calorica che si verifica mediante la glicosuria, dall'altro al catabolismo proteico che causa atrofia muscolare. Accanto ai comuni segni clinici del diabete non complicato, si possono osservare anche altri segni clinici associati alle complicazioni che caratterizzano l'iperglicemia cronica quali, ad esempio, cecità improvvisa da cataratta nel cane, neuropatia periferica, più facilmente riconoscibile nel gatto poiché più eclatante e caratterizzata da postura plantigrada (Feldman e Nelson, 2004).

Altre complicazioni più o meno frequentemente osservabili includono nefropatia diabetica, sintomi gastroenterici, patologie retiniche e le infezioni batteriche; queste ultime presentano un'elevata incidenza e interessano soprattutto le vie urinarie (Patterson e Andriole, 1997; McGuire et al., 2002), ma anche la cute (Peikes et al., 2001) e l'apparato respiratorio (Goy-Thollot et al., 1994). L'elevata incidenza delle infezioni batteriche nel paziente diabetico dipende da una condizione di immunodepressione; i neutrofili del cane diabetico mostrano, infatti, una diminuita capacità di adesione ai substrati direttamente proporzionale alla concentrazione ematica del glucosio (Latimer e Mahaffey, 1984). La ridotta attività dei neutrofili sembra dipendere da un fattore presente a livello ematico quale, probabilmente, il glucosio stesso (Stickle et al., 1986) e un buon controllo glicemico può, tuttavia, migliorare l'adesività dei neutrofili e, pertanto, ridurre la comparsa di infezioni secondarie (Latimer e Mahaffey, 1984). Esistono altri deficit del sistema immunitario quali il complemento, l'attività umorale e l'attività cellulo-mediata (Diehl, 1995).

1.4.5 Indagini Collaterali

Esame Emocromocitometrico

Nel diabete mellito non complicato non si osservano alterazioni; si può eventualmente rilevare policitemia relativa conseguente a disidratazione. La presenza di leucocitosi può essere suggestiva di un'infezione in atto o di pancreatite. Il riscontro di neutrofili in preda a fenomeni di tossicosi o degenerati o un evidente spostamento a sinistra della formula leucocitaria verso l'immatùrità potrebbero indicare un processo settico in atto.

Esame Ematobiochimico

Le alterazioni eventualmente riscontrabili sono anche in relazione al tempo trascorso tra comparsa della malattia e diagnosi ed è utile al fine di indagare la presenza di eventuali patologie concomitanti. In un soggetto non scompensato, spesso si riscontra solamente iperglicemia e iperlipemia. Spesso si osserva un aumento dei livelli plasmatici di trigliceridi, colesterolo, lipoproteine, chilomicroni e acidi grassi liberi che contribuiscono alla comparsa di un plasma iperlipemico. La lipemia dipende da un calo dell'attività della lipoproteino-lipasi causata dalla deficienza di insulina. Questo enzima favorisce il metabolismo di lipoproteine a densità molto ridotta e dei chilomicroni e, pertanto, un calo della sua attività si traduce in iperlipemia (Goy-Thollot et al., 1994; Feldman e Nelson, 2004).

Anche gli enzimi epatici (ALT, AST, SAP) possono essere aumentati e ciò dipende dalla sofferenza epatica indotta da fenomeni quali: infiltrazione lipidica (lipidosi, steatosi), pancreatite, ipossia, sepsi, acidosi.

A seguito di iperglicemia si forma un legame irreversibile e non enzimatico tra glucosio e proteine quali fruttosamine ed emoglobina glicosilata. Le fruttosamine rappresentano il legame tra glucosio e proteine (in genere albumine) (Famigli Bergamini et al., 1992; Kawamoto et al., 1992), mentre l'emoglobina glicosilata nasce dal legame tra glucosio ed emoglobina

(Delack e Stogdale, 1983; Famigli Bergamini et al., 1992; Elliott et al., 1997). Queste alterazioni vengono sfruttate anche per la diagnosi e il monitoraggio della patologia, in quanto forniscono un dato riguardo alla media glicemica del soggetto nelle precedenti 2-3 settimane e 6-8 settimane, rispettivamente per quanto concerne le fruttosamine e l'emoglobina glicosilata.

La chetoacidosi diabetica rappresenta una temuta e grave complicanza della patologia diabetica e, accanto al corredo sintomatologico, si accompagna ad alterazioni elettrolitiche e a squilibri acido-base.

Esame urinario

Reperti comuni sono: glicosuria, chetonuria, proteinuria, talvolta batteriuria associata o meno a piuria o ematuria.

La proteinuria può dipendere dalla presenza di infezione batterica o di una glomerulopatia (Struble et al., 1998).

L'assenza di batteri non permette di escludere la presenza di infezioni urinarie, spesso occulte (McGuire et al., 2002), pertanto sarebbe raccomandabile eseguire un prelievo di urine in modo asettico (cistocentesi) e sottoporre il campione ad esame batteriologico e relativo antibiogramma.

Il peso specifico delle urine, nonostante la poliuria, generalmente è > 1.025 grazie alla presenza di glucosio; nel caso in cui il peso specifico sia < 1.020 è opportuno indagare la presenza di una patologia concomitante (es. nefropatia cronica o ipercortisolismo).

1.4.6 Diagnosi

La diagnosi si basa sul rilievo contemporaneo di iperglicemia a digiuno e glicosuria.

Queste alterazioni permettono una tempestiva diagnosi di DM, tuttavia si ricorre anche alla valutazione di emoglobina glicosilata e/o fruttosamine, che rappresentano delle sostanze che aumentano in una situazione patologica (iperglicemia), ma che vengono sfruttate nella diagnosi e, soprattutto, nel monitoraggio del paziente diabetico.

Per quanto concerne l'emoglobina glicosilata; essa presenta una concentrazione normale pari al 3% nel cane (1,7 – 4,9%) (Elliot et al., 1997). In generale, nei soggetti affetti da DM assume valori compresi tra 6 e 15,5% (variabili a seconda del laboratorio) (Feldman e Nelson, 2004). Valori > 7% indicano un inadeguato controllo; valori > 8% indicano un'assoluta mancanza di controllo glicemico; in genere valori compresi tra 4 e 6% corrispondono ad un buon miglioramento dei segni correlati all'iperglicemia (Feldman e Nelson, 2004). In pratica si considera accettabile un valore < 6,5% (Elliott et al., 1997). Questo parametro aumenta solo dopo 2-3 settimane di iperglicemia persistente e indica la media glicemica dei precedenti 2-3 mesi (Feldman e Nelson, 2004).

Le fruttosamine aumentano dopo soli 4 giorni di iperglicemia e riflettono la glicemia delle precedenti 2–3 settimane (Famigli Bergamini et al., 1992; Kawamoto et al., 1992).

La concentrazione media negli animali sani si aggira su valori medi di $301,53 \pm 24 \mu\text{mol/L}$ (Famigli Bergamini et al., 1992); il range di riferimento può essere variabile a seconda del laboratorio. Valori > 500 $\mu\text{mol/L}$ suggeriscono un inadeguato controllo; valori > 600 $\mu\text{mol/L}$ indicano un'assoluta mancanza di controllo glicemico. Nei diabetici i valori sono compresi tra 320 e 850 $\mu\text{mol/L}$ (Feldman e Nelson, 2004). Valori compresi tra 350 e 450 $\mu\text{mol/L}$ corrispondono, in genere, ad un soddisfacente controllo glicemico (Feldman e Nelson, 2004).

1.4.7 Terapia

Lo scopo della terapia nei nostri animali è quello di ridurre i segni clinici e il rischio di complicanze che si sviluppano in uno stato di iperglicemia cronica, cercando di mantenere i livelli glicemici più possibilmente vicini ai valori fisiologici. Il trattamento prevede il sinergismo tra fattori terapeutici, dieta ed esercizio fisico moderato e costante. E' importante inoltre prevenire e controllare eventuali patologie concomitanti o complicanze che renderebbero meno efficace la terapia insulinica grazie a meccanismi di insulino-resistenza da esse indotte. Per quanto riguarda i cani affetti da DM di sesso femminile, è opportuno procedere tempestivamente ad ovariectomia al fine di ridurre l'insulino-resistenza indotta dal progesterone nella fase diestrale del ciclo (Eigenmann et al., 1983; Selman et al., 1994).

Il soggetto sottoposto a terapia insulinica deve poi essere sottoposto a controlli periodici che hanno lo scopo di monitorare il paziente e di effettuare eventuali opportune modifiche nella terapia. I controlli consistono nella raccolta anamnestica, nella visita clinica e nell'esecuzione di curve glicemiche accanto alla determinazione di fruttosamine o emoglobina glicosilata.

1.4.8 Ipertensione e Diabete Mellito

Diabete Mellito ed ipertensione nell'uomo spesso coesistono e questa associazione, raddoppia il rischio di comparsa di malattie cardiovascolari. L'incidenza dell'ipertensione nella popolazione umana varia dal 40 all'80% e la prevalenza dell'ipertensione è correlata alla durata della sindrome iperglicemica (Sowers e Zemel, 1990). Nel cane e nel gatto l'aumento della Pa è comunemente associato a diverse malattie sistemiche e ad endocrinopatie quali diabete mellito (Struble et al., 1998) ed iperadrencorticismo (Danese ed Aron, 1994; Ortega et al., 1996; Goy-Thollot et al., 2002).

Nell'uomo, I disturbi cardiovascolari secondari a DM sono conseguenti alla comparsa di microangiopatia diabetica che si sviluppa in prevalenza nel distretto renale (Navalesi et al., 1995); ipertensione ed iperglicemia concorrono allo sviluppo di lesioni vascolari ed aterosclerosi (Tuck, 1990).

Su 50 cani affetti da DM (Struble et al., 1998) è stata studiata la prevalenza e la gravità di ipertensione e di proteinuria ed è stata eseguita la loro comparazione con età, sesso, durata della patologia e controllo glicemico. La Pa è stata misurata mediante tecnica oscillometrica e sono stati considerati ipertesi i soggetti con SAP > 160 mmHg; DAP > 100 mmHg; MAP > 120 mmHg. In base a ciò il 46% dei soggetti indagati presentavano ipertensione; questo dato si avvicina alla Medicina Umana (Struble et al., 1998). Nell'uomo la prevalenza dell'ipertensione è correlata alla durata della patologia e la gravità è influenzata dal controllo glicemico del paziente. L'età e il sesso, da questa indagine (Struble et al., 1998), non sono risultate significativamente correlati all'ipertensione sistemica. Il controllo glicemico è stato giudicato in base ai dati anamnestici e ai livelli di fruttosamine ed emoglobina glicosilata. Una concentrazione di quest'ultima > 6% rappresentava uno scarso controllo così come un valore > 500 µmol/L per le fruttosamine. In base a questo giudizio arbitrario e soggettivo, la comparazione controllo glicemico ed ipertensione non sono risultati significativamente correlati. Solo la DAP e la MAP erano significativamente più alte nei soggetti da più tempo affetti dalla patologia.

I meccanismi coinvolti nell'ipertensione dell'uomo diabetico non sono ancora del tutto chiariti; ritenzione di sodio, vasculopatie, nefropatia sono i fattori che si ritengono responsabili dell'aumento della Pa. Tuttavia, nonostante sia ormai assodato che l'uomo diabetico sia a rischio di ipertensione e patologia renale, non è chiaro se l'aumento di pressione sia conseguente ad una patologia renale subclinica o se le persone ipertese siano maggiormente a rischio di sviluppo di nefropatia e microalbuminuria.

1.5 Iperadrenocorticismo o ipercortisolismo (Hypercortisolism: HC)

L'iperadrenocorticismo, nel cane rappresenta una sindrome che esita da uno stato di ipercortisolemia cronico. Può essere causata da:

- Neoplasia ipofisaria (Pituitary Dependent Hyperadrenocorticism: PDH o malattia di Cushing) che rappresenta la forma più comune (Ihle, 1997);
- Neoplasia surrenalica (Adrenal Tumor Hyperadrenocorticism: ATH o sindrome di Cushing); dipende dalla presenza di un adenoma o un adenocarcinoma secernente cortisolo (Kintzer e Peterson, 1997);
- Iatrogena per somministrazione eccessiva e prolungata di glicocorticoidi (Behrend e Kempainen, 1997).

Di recente è stato introdotto il termine ipercortisolismo al posto di iperadrenocorticismo; ciò trova giustificazione nel fatto che l'iperadrenocorticismo comprende anche l'iperaldosteronismo, mentre con ipercortisolismo si vuole intendere uno stato di ipercortisolemia cronica associato ad un corredo sintomatologico da esso dipendente.

1.5.1 Segnalamento

L'ipercortisolismo si manifesta generalmente nei soggetti di età compresa tra 6 e 16 anni, in media a circa 10 anni (PDH) e 11 anni (ATH) (Feldman e Nelson, 2004).

La forma ipofisaria colpisce in prevalenza i soggetti di peso < 20 kg (75%). Le neoplasie surrenaliche, al contrario, sono di più frequente riscontro nei cani di peso > 20 kg.

Le razze a maggior rischio sono il Barboncino Nano, il Bassotto, il Beagle, il Boxer, il Labrador, il Pastore Tedesco e i Terrier (Feldman e Nelson, 2004).

1.5.2 Eziopatogenesi

Ipercortisolismo ipofisi-dipendente o Pituitary Dependent

Hyperadrenocorticism (PDH) o Malattia di Cushing

Rappresenta la forma più frequente (85%) e dipende dalla presenza di una neoplasia ipofisaria che secreta una quantità eccessiva di ACTH; ciò causa un'ipersecrezione di glicocorticoidi da parte delle ghiandole surrenaliche che diventano iperplastiche. Nella maggior parte dei casi si tratta di microadenomi; in una percentuale (15-25%) minore di casi si tratta di macroadenomi (Duesberg et al., 1995).

Ipercortisolismo surrenale-dipendente o Adrenal Tumor

Hyperadrenocorticism (ATH) o Sindrome di Cushing

La causa è una neoplasia surrenalica secernente cortisolo autonomamente rispetto al controllo ipofisario. La produzione di cortisolo è indipendente dal "feed-back" negativo che normalmente regola l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Di solito è monolaterale, tuttavia, anche se raramente, può essere bilaterale (Reusch e Feldman, 1991).

L'eccesso di cortisolo prodotto inibisce la produzione di ACTH da parte dell'adenoipofisi; ne deriva un'atrofia della porzione di surrenale non interessata dalla lesione e/o della surrenale contro laterale non neoplastica.

I tumori surrenalici sono nel 50% dei casi benigni e nel 50% maligni (Behrend e Kemmpained, 2001).

Ipercortisolismo iatrogeno

Per somministrazione prolungata di glicocorticoidi esogeni si verifica un'atrofia bilaterale surrenalica per inibizione sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene accanto al corredo sintomatologico sovrapponibile alla malattia spontanea.

1.5.3 Rilievi Clinici

I sintomi conseguenti all'ipercortisolemia cronica possono essere numerosi e variabilmente associati tra loro e non uguali per gravità tra i soggetti.

Poliuria (PU) e Polidipsia (PD)

Presenti nella maggior parte dei casi (80-85%). La quantità di acqua assunta dal soggetto affetto da questa endocrinopatia è pari a 2-10 volte la quantità normale (che è, in media, 40-60 ml/kg/dì) e quindi superiore alla soglia che definisce la polidipsia nel cane (> 100 ml/kg/dì).

Il cortisolo interferisce con l'azione dell'ormone antidiuretico (ADH) a livello renale (diabete insipido neurogenico), determina una diminuita produzione di ADH a livello ipofisario (diabete insipido centrale) (Munich et al., 1976) e, inoltre, determina un aumento della velocità di filtrazione glomerulare (*Glomerular Filtration Rate*: GFR).

Polifagia (PF):

L'appetito abnorme sembra dipendere da un'azione diretta operata dal cortisolo che, probabilmente, determina un'azione anti-insulinica con conseguente minor utilizzo del glucosio da parte dei tessuti periferici. E' presente in oltre il 90% dei casi.

Aumento di volume addominale—c.d. “addome a botte”

Presente nell'80 % dei casi; dipende da fenomeni di redistribuzione lipidica addominale congiuntamente ad un calo della tonicità della muscolatura addominale indotto dall'effetto catabolico proteolitico del cortisolo. Inoltre avrebbero un ruolo anche l'epatomegalia e la sovra distensione vescicale (Feldman e Nelson, 2004).

Astenia muscolare e Letargia

Il cortisolo ha un'azione proteocatabolica che si traduce in ipotrofia muscolare e quindi, clinicamente, in intolleranza all'esercizio fisico. La

letargia è probabilmente conseguenza dell'astenia e dell'alterazione muscolare (Feldman e Nelson, 2004).

Dermopatie

In genere il prurito è assente, a meno che non subentrino piodermiti secondarie. L'alopecia simmetrica bilaterale è la patologia cutanea più frequente ed origina da atrofia dell'unità pilosebacea che causa alopecia e mancata ricrescita del pelo. In genere si localizza al tronco e risparmia testa e arti (Feldman e Nelson, 2004). Inoltre si osserva assottigliamento della cute e fragilità vascolare con tendenza alla comparsa di ematomi, soffiusioni e petecchie. Possibili sono le infezioni secondarie conseguenti all'effetto immunodepressivo indotto dal cortisolo. Grazie a quest'ultimo si possono sviluppare micosi o demodicosi (Hillier e Desch, 2002). Spesso sono presenti comedoni e aree di iperpigmentazione focale o diffusa. Meno comunemente si osserva la deposizione di calcio nel derma e nel sottocute, che prende il nome di "Calcinosis cutis" (2-8% dei casi) (Peterson, 1984).

Dispnea

Compare a causa della debolezza della muscolatura respiratoria e del deposito lipidico nel distretto toracico. Inoltre l'epatomegalia può causare compressione a carico del diaframma. Altre cause includono le calcificazioni distrofiche a carico dell'interstizio polmonare e fenomeni trombo embolici (Feldman e Nelson, 2004).

Alterazioni della Riproduzione e del Ciclo Estrale

Ci può essere atrofia testicolare nel maschio e alterazioni del ciclo estrale/anestro nella femmina.

Pseudomiopia

Rara, si manifesta con rigidità muscolare, contrazioni muscolari persistenti dopo uno sforzo muscolare ed alterazioni all'elettromiografia. La causa è a tutt'oggi non nota (Feldman e Nelson, 2004).

Sintomi Neurologici

Si possono osservare in caso di presenza di un macroadenoma grazie ai fenomeni compressivi da esso determinati. Si osservano alterazioni dello stato mentale (ottundimento del sensorio), atassia, compulsione, disorientamento e tetraparesi (Kipperman et al., 1992).

1.5.4 Indagini Collaterali

Esame Emocromocitometrico

Può essere evidente il c.d. "leucogramma da *stress*" caratterizzato da neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e monocitosi. Può esserci anche trombocitosi (Reusch, 2005).

Esame Ematobiochimico

Comunemente si osserva un aumento della fosfatasi alcalina (SAP). Il cortisolo determina infatti l'aumento di un isoenzima della SAP che aumenta nell'85% dei soggetti (Feldman e Nelson, 2004).

Gli enzimi epatici sono, in genere, aumentati a causa dell'epatopatia da steroidi e, nel 90% dei casi, si osserva iperlipemia dovuta all'effetto lipolitico del cortisolo. L'insulino-resistenza e l'aumento della gluconeogenesi indotte dal cortisolo possono causare un lieve incremento della glicemia che, tuttavia, sfocia in un diabete mellito manifesto solamente nel 5–10% dei casi (Feldman e Nelson, 2004). Altre alterazioni includono: diminuzione di urea e creatinina, ipofosfatemia e ipokaliemia per l'aumentata diuresi, ipernatremia (Feldman e Nelson, 2004).

Esame Urinario

L'alterazione più evidente è un calo del peso specifico (P.S.) urinario; nell'85% dei casi il P.S. è < 1.020. Si può osservare anche proteinuria per presenza di infezioni urinarie o per azione diretta sulla GRF operata dal cortisolo (Ortega et al., 1994; Ortega et al., 1996; Hurley e Vaden, 1998).

1.5.5 Diagnosi

Test di stimolazione con ACTH

Il test di stimolazione con ACTH rappresenta un test di "screening" utile per confermare l'ipercortisolemia; rappresenta inoltre il test specifico diagnostico per l'ipercortisolismo iatrogeno. E' un test di semplice esecuzione e relativamente poco dispendioso.

Il protocollo di più recente uso prevede la misurazione di cortisolo basale e ad un'ora (T₁) dalla somministrazione di ACTH sintetico (0,25 mg/cane) per via endovenosa o intramuscolare (Feldman e Nelson, 2004). Il range di riferimento per il cortisolo basale è 0.5-6.0 µg/dl e il range fisiologico post-stimolazione con ACTH è 6-17 µg/dl. Valori post-stimolazione compresi tra 17 e 22 µg/dl sono considerati dubbi (*borderline*), mentre valori ≥ 22 µg/dl si considerano suggestivi di ipercortisolismo (Feldman e Nelson, 2004). Questo test, tuttavia, presenta una sensibilità non troppo elevata poiché solo, approssimativamente, nel 30 % dei casi di cani con PDH il valore post-stimolazione è ≥ 22 µg/dl e, quindi, positivo. In un ulteriore 30 % di cani con PDH il cortisolo ad un'ora dalla somministrazione di ACTH è *borderline*, cioè compreso tra 17 e 22 µg/dl. Pertanto, circa nel 40 % dei soggetti con PDH il cortisolo post-stimolazione con ACTH presenta valori all'interno del range di riferimento (Feldman e Nelson, 2004). La sensibilità di questo test è analoga a quella riportata in Medicina Umana (Feldman e Nelson, 2004) in cui il test è stato abbandonato a causa della sensibilità piuttosto bassa. In alcuni studi si ammette una maggiore sensibilità di questo test (Kaplan et

al., 1995; Van Liew et al., 1997). Rappresenta però il *test* di elezione nel caso di iperadrenocorticismo iatrogeno ed è l'unico *test* impiegato nel monitoraggio terapeutico in Medicina Veterinaria.

Nel caso di neoplasia surrenalica (ATH), circa il 60 % dei soggetti hanno una risposta positiva a questo *test* che si traduce in un aumento patologico del cortisolo post-stimolazione con ACTH a livelli "*borderline*" o francamente aumentati. Tuttavia, circa il 40 % dei soggetti con neoplasia surrenalica possono mostrare un cortisolo a T₁ nel range di riferimento a causa di una mancata presenza di recettori per l'ACTH.

Test di soppressione con desametasone a basse dosi (LDDS: *Low-Dose Dexamethasone Test*)

Rappresenta un *test* sia diagnostico ("*screening*") che discriminante, in quanto permette di differenziare PDH ed ATH sfruttando il meccanismo di "*feed back* negativo" operato dal cortisolo sulla liberazione di ACTH ipofisario. Nel cane sano, la somministrazione di corticosteroidi esogeni determina un'inibizione nella produzione di ACTH e, quindi, una mancata produzione di cortisolo da parte delle ghiandole surrenali. L'inibizione si verifica per 24-48 ore dalla somministrazione di glicocorticoidi (Feldman e Nelson, 2004). Il protocollo di esecuzione prevede la misurazione dei livelli basali di cortisolo (T₁) seguita dalla somministrazione endovenosa di 0.01 mg/kg di desametasone e, quindi, ulteriori misurazioni del cortisolo ematico a 4 (T₄) e a 8 (T₈) ore. La cortisolemia a T₈ permette di confermare la diagnosi di ipercortisolemia: nel soggetto sano il cortisolo a T₈ è < 1 µg/dl; valori tra 1 e 1.4 µg/dl rappresentano una risposta dubbia; valori > 1.4 µg/dl confermano la diagnosi di HC (Feldman e Nelson, 2004).

La cortisolemia a 4 ore (T₄) permette, nella maggioranza dei casi, di differenziare l'origine dell'ipercortisolemia (PDH o ATH).

Nel cane sano già a T₄ la cortisolemia è < 1.4 µg/dl.

Nei soggetti con PDH a T₄ esistono diverse possibilità:

- a. Il 20 % dei soggetti non mostra alcuna soppressione del cortisolo ematico a T₄ (analogamente a quanto avviene nei soggetti con ADH).
- b. Il 20 % mostra un lieve calo (ma non < a 1.4 µg/dl).
- c. Il 30 – 40% ha un valore di cortisolo a T₄ ≤ 50 % del valore basale (ma non < a 1.4 µg/dl).
- d. Il 25% dei soggetti mostra una cortisolemia a T₄ < a 1.4 µg/dl.

Se ne deduce che solo nel 60% dei soggetti il *test* sia di ausilio diagnostico per differenziare PDH e ADH, mentre nelle prime due risposte al *test* si ha solo conferma di ipercortisolismo (HC).

In aggiunta alla “resistenza al desametasone” presente nei cani con HC, un’ulteriore spiegazione alla mancata soppressione nella produzione di cortisolo, soprattutto nel caso sia presente un PDH, risiede nella maggiore velocità nella *clearance* del desametasone nei soggetti con HC rispetto ai cani sani. Infatti, in approssimativamente il 75% dei cani con HC, il desametasone viene eliminato dal plasma in un tempo inferiore alle 8 ore (circa 3-6 ore); questo fatto spiega il transitorio calo di cortisolo a 4 ore, ma non a 8 ore (Kemppainen e Peterson, 1993).

Nel caso sia presente un ATH, siccome è la neoplasia che produce cortisolo in modo autonomo e indipendente dal *feed-back* negativo, con questo *test* si ha la mancata soppressione sia a T₄ che a T₈; Pertanto il prelievo a T₄ è utile al fine di discriminare riguardo all’origine dell’ipercortisolismo, poiché a T₈ in entrambi i casi si osserva una mancata soppressione (Feldman e Nelson, 2004). Il *test* può, comunque, risultare dubbio a causa delle fisiologiche fluttuazioni del cortisolo nell’arco della giornata se il momento del prelievo corrisponde al *nadir* della cortisolemia (Feldman et al., 1996).

Test di soppressione con desametasone ad alte dosi (HDDS: *High-Dose Dexametasone Suppression Test*)

Questo *test* è di utile impiego nei casi in cui il LDDS non sia stato sufficiente per differenziare PDH e ATH; infatti, una neoplasia ipofisaria che non ha risposto a dosaggi pari a 0.01 mg/dl, potrebbe rispondere ad un dosaggio superiore. Nel caso di ATH, invece, nonostante l'impiego di un dosaggio elevato non si osserverà alcuna soppressione (Feldman e Nelson, 2004).

L'esecuzione del test è la medesima del LDDT, ma con dosaggio dieci volte maggiore (0.1 mg/kg) (Feldman e Nelson, 1996). E' importante sottolineare che, circa il 15-25% dei soggetti con PDH, non presenta alcuna soppressione comportandosi, quindi, come un ATH (Behrend e Kempainen, 2001).

Rapporto Urinario Cortisolo/Creatinina (UC:CR)

UC:CR, può essere aumentato per aumento di secrezione di cortisolo in corso di HC, ma anche in caso di altre numerose patologie e condizioni stressanti. Rappresenta, pertanto, un test a bassa specificità (molti falsi positivi), pur presentando una sensibilità pari al 100% (Reusch, 2005). UC:CR è un test diagnostico, ma non discriminante. Per renderlo tale è possibile eseguire un test di soppressione ad alte dosi e, nel contempo, stimare il UC:CR. Questo test si esegue prelevando le urine per minzione spontanea per 2 mattine consecutive; dopo il secondo prelievo di urine si somministra 0,1 mg/kg di desametasone per bocca per tre volte a distanza di 8 ore l'una dall'altra. Si preleva poi un terzo campione di urine per caduta dopo 8 ore dall'ultima somministrazione di desametasone. Sui tre campioni di urina si valuta il UC:CR. Il test è indicativo di HC se UC:CR nel terzo campione è meno del 50% del valore medio di UC:CR dei primi due.

Ecografia addominale

L'esame ecografico consente di visualizzare forma, dimensioni ed eventuali alterazioni strutturali delle ghiandole surrenali; inoltre è mezzo utile per visualizzare gli altri organi più o meno alterati in corso di HC (Reusch e Feldman, 1991).

Le surrenali normali vengono definite mediante misurazione della larghezza della surrenale sinistra, in cui il limite superiore fisiologico è 7,5 mm (Feldman e Nelson, 2004). Nel 97% di casi con PDH la forma, i contorni, l'ecogenicità e l'ecostruttura delle surrenali sono rispettate, sia pur aumentate bilateralmente.

In corso di ATH la surrenale neoplastica può essere variabilmente alterata per struttura ed ecogenicità e i contorni possono apparire irregolari (Grooters et al., 1996). La surrenale controlaterale non neoplastica può apparire normale o più frequentemente atrofica. Esistono , seppur raramente casi di neoplasia bilaterale surrenalica (Hoerauf e Reusch, 1999); in tal caso sarà evidente un'iperplasia bilaterale con alterazione di ecostruttura ed ecogenicità.

Tomografia computerizzata

La tomografia computerizzata (TC) può essere utilizzata per evidenziare ipofisi e/o ghiandole surrenali. Utile anche per confermare od escludere la presenza di macroadenomi ipofisari.

1.5.6 Terapia

La terapia dell'HC può essere sia medica che chirurgica, quest'ultima rappresenta il trattamento di elezione per le neoplasie surrenaliche e i macroadenomi ipofisari (ipofisectomia)

Terapia del PDH

In Medicina Umana si ricorre all'asportazione dell'ipofisi mediante approccio transfenoidale, che rappresenta il trattamento di elezione dei tumori pituitari (Mampalam et al., 1988). Anche nel cane questo tipo di intervento è stato eseguito con successo (Lantz et al., 1988; Niebauer e Evans, 1988; Niebauer et al., 1990; Meij et al., 1998; Meij, 2001) e, secondo alcuni Autori, rappresenta il trattamento di elezione del PDH canino (Meij et al., 1998). Tuttavia, l'intervento non è certo di facile esecuzione e richiede, pertanto, notevoli competenze chirurgiche.

La terapia medica ha previsto, in passato, l'impiego di numerosi farmaci più o meno efficaci nel ridurre la sintomatologia.

Il mitotano è un derivato del DDT. Agisce determinando la necrosi della zona reticolare e fascicolata della corticale del surrene, generalmente risparmiando la zona glomerulare che, tuttavia, può essere interessata dalla necrosi in modo parziale o totale (Kirk e Jensen, 1975).

Esistono due protocolli di impiego di questo farmaco (Kintzer e Peterson, 1991; Feldman e Nelson, 2004);

- Protocollo *standard*: è il protocollo maggiormente accettato dagli Autori ("lisi adrenocorticale selettiva") prevede la somministrazione giornaliera di farmaco con il cibo nella fase di induzione (5-14 giorni) che rappresenta la fase in cui si induce una insufficienza surrenalica relativa controllata; segue poi la fase di mantenimento con somministrazioni settimanali (Feldman e Nelson, 2004).
- Protocollo alternativo ("lisi adrenocorticale non selettiva") che prevede la lisi totale della corticale del surrene mediante elevati dosaggi di mitotano, seguita dalla supplementazione giornaliera di glicocorticoidi e mineralcorticoidi a vita (Rijnberk e Belshaw, 1988; Den Hertog et al., 1999).

Il ketoconazolo è un antimicotico che deriva dall'imidazolo (Vanden Bossche et al., 1990). A dosi elevate, ha effetto inibente sulla biosintesi degli steroidi, determinano perciò una soppressione nella secrezione di cortisolo. L'elevato costo del farmaco però, accanto alla elevata percentuale di insuccessi (20-25%) e la necessaria doppia somministrazione quotidiana ne hanno limitato l'impiego.

Il trilostano è un inibitore del 3 β -idrossisteroide deidrogenasi che è responsabile della conversione del pregnenolone a progesterone e del 17-idrossipregnenolone a 17-idrossiprogestosterone nella corticale del surrene. Cortisolo, aldosterone e androstenedione vengono prodotti a partire dal progesterone e 17-idrossipregnenolone e il trilostano inibisce la produzione di progesterone e di 17-idrossiprogestosterone, con conseguente inibita produzione dei vari steroidi prodotti dalle surrenali, dalle gonadi e dalla placenta (Potts et al., 1978). L'azione inibitoria di tale sintesi da parte delle surrenali avviene a dosaggi inferiori rispetto a quelle necessarie ad inibire la medesima sintesi in altri organi.

In Medicina Veterinaria ha trovato, negli ultimi tempi, largo impiego soprattutto nel PDH, ma anche nel caso di ATH (Hurley et al., 1998; Eastwood et al., 2003; Fracassi et al., 2007); nel caso di neoplasia surrenalica è indicata anche come terapia da impiegare nella fase di preparazione del soggetto all'intervento chirurgico.

Dagli studi che hanno impiegato questo farmaco, è evidente un significativo miglioramento dei segni clinici (Hurley et al., 1998; Neiger et al., 2002; Fracassi et al., 2007). Nella maggior parte dei casi si osserva una rapida remissione di poliuria/polidipsia (PU/PD) e astenia, mentre un tempo maggiore per la remissione richiedono, in genere, le alterazioni dermatologiche (Neiger et al., 2002; Ruckstuhl et al., 2002; Fracassi et al., 2007). La risposta terapeutica può essere, tuttavia, variabile tra gli individui (Neiger e Hurley, 2001). I dosaggi impiegati ad oggi in letteratura sono

quanto mai variabili e compresi tra dosaggi medi pari a 19mg/kg SID (Braddock et al., 2003) a $5,9 \pm 2,27$ (Fracassi et al., 2007). E' da sottolineare, tuttavia, come i cambiamenti di dosaggio, nei diversi lavori, siano stati stabiliti in base alla remissione o meno dei sintomi clinici e ai risultati ottenuti al *test* di stimolazione con ACTH; in alcuni studi non si precisa se il *test* sia stato eseguito nei tempi indicati e cioè a 2-6 ore dall'assunzione del farmaco che rappresenta il momento di massima efficacia del farmaco. Le indicazioni attuali concordi all'opinione di numerosi Autori consigliano un dosaggio iniziale di 2-5 mg/kg ed eventuale incremento progressivo ai futuri controlli.

Il farmaco è ben tollerato e, grazie all'azione reversibile, gli effetti collaterali eventualmente conseguenti ad una insufficienza surrenalica sono piuttosto rari e frequentemente reversibili. E' segnalato, tuttavia, un caso di decesso per necrosi surrenalica (Chapman et al., 2004).

Le indicazioni riguardo ai controlli prevedono controlli a 1, 3, 6, 13 settimane dall'inizio della terapia. I controlli successivi avverranno a 6 mesi e a 12 mesi. Ogni visita deve comprendere raccolta anamnestica, visita clinica e *test* di stimolazione con ACTH. Il *test* deve essere eseguito a 2-6 ore dall'assunzione del farmaco e il cortisolo ematico post stimolazione deve mantenersi a livelli compresi tra 1,4 e 5,4 µg/dl (Vetoryl Consensus Meeting: Amsterdam 19 Aprile 2006).

Terapia dell'ATH

Nel caso sia presente una neoplasia surrenalica è possibile procedere al trattamento chirurgico che consiste nella surrenalectomia della ghiandola neoplastica. E' importante, tuttavia, procedere ad alcune valutazioni per stabilire se il soggetto si un buon candidato alla chirurgia. E' di fondamentale importanza valutare l'eventuale presenza di ipertensione e/o proteinuria poiché un loro aumento si traduce in maggior rischio a sviluppare fenomeni tromboembolici (Nichols, 1990; Ortega et al., 1996;

Jacoby et al., 2001). Importante anche è valutare l'antitrombina III che non deve essere diminuita (Feldman e Nelson, 2004). Nel caso di forte debilitazione del soggetto è indicato rispettare un tempo di stabilizzazione mediante terapia medica per 1-3 mesi con trilostano.

Nella fase intra-operatoria e nelle successive 6 ore del post-operatorio è importante supplementare con desametasone endovena (0,05–0,1 mg/kg) che verrà somministrato 2 o più volte nel corso della giornata in cui si esegue l'intervento.

Nei giorni seguenti lo stesso dosaggio verrà somministrato 2 o 3 volte al dì per via parenterale (sottocute); seguirà poi la somministrazione orale quando non ci sarà più il rischio di vomito (Feldman e Nelson, 2004).

Chiaramente, nel caso in cui l'esame ecografico abbia evidenziato la presenza di metastasi, sarà opportuno evitare la chirurgia e sarà possibile un trattamento sintomatico.

1.5.7 Ipercortisolismo (HC) ed Ipertensione

La prevalenza dell'ipertensione nell'HC è, approssimativamente, pari all'80% (Danese e Aron, 1994) ed è un reperto talmente comune nell'HC che, in passato, è stato utilizzato come fattore fortemente indicativo di HC nel caso di sospetto diagnostico (Nugent et al., 1964).

E' associata ad ogni forma di HC, anche se, studi in Medicina Umana, sostengono che, nel caso di HC iatrogeno, circa nel 20% dei casi sia conseguente e proporzionale al danno renale farmaco-indotto (Treadwell et al., 1964).

In Medicina Umana e nel cane, l'HC è associato ad una serie di complicazioni d'ordine medico, incluso ipertensione sistemica, glomerulopatie, iperlipemia, immunodepressione, insulino-resistenza, diabete mellito, pancreatiti, miopatie, insufficienza cardiaca congestizia, tromboembolismo polmonare (Feldman e Nelson, 2004). Ognuna di queste

complicazioni è in grado di alterare la qualità della vita del soggetto e di interferire sul tempo di sopravvivenza. Circa il 40% dei soggetti con ipertensione (Hypertension: HT) mostrano complicanze cardiovascolari ad essa conseguenti. Inoltre, l'ipertensione secondaria ad HC è spesso refrattaria alle terapie antiipertensive e, di frequente, persiste anche dopo trattamento dell'ipercortisolemia, anche se in maniera meno grave (Ortega et al., 1996). Indagando la prevalenza e la severità di ipertensione sistemica e proteinuria in 92 cani con HC (78 con PDH e 14 con ATH) (Ortega et al., 1996) è emersa una percentuale di cani ipertesi pari all'86% (cani con PDH non trattati) e del 81% (cani con controllo inadeguato) e, quindi, maggiore rispetto al 59% riportato da un precedente studio (Kallet e Cowgill, 1992). Per la pressione arteriosa è stato impiegato un metodo oscillometrico e sono stati considerati ipertesi i soggetti che presentavano i seguenti valori pressori: SAP > 160 mmHg, DAP > 100 mmHg, MAP > 120 mmHg.

Da questo studio, si deduce come l'ipertensione affligga maggiormente i soggetti non sottoposti a terapia o comunque non sottoposti ad adeguato controllo della disendocrinia (86%) rispetto ai soggetti adeguatamente trattati (40%) (Ortega et al., 1996).

Infatti, i soggetti con PDH non o inadeguatamente trattati presentavano valori pressori (SAP e DAP) significativamente più elevati rispetto ai soggetti con PDH controllato e quelli con ATH sottoposti a surrenalectomia, mentre non è stata osservata una differenza significativa di Pa tra cani non trattati o non sottoposti a buon controllo sia nel caso di PDH che ATH. Tra i soggetti trattati, non vi era differenza significativa di Pa, a prescindere che la neoplasia fosse surrenalica o ipofisaria. Tra quelli ipertesi, il 14% presentava ipertensione grave (SAP > 190 mmHg e DAP > 130 mmHg); anche nell'uomo, circa il 10% degli individui è affetto da ipertensione grave. In Medicina Umana il 100% dei soggetti con adenocarcinoma surrenalico è iperteso, mentre nel caso di adenoma la prevalenza scende al 70-80% e nel caso di PDH al 64% (Ortega et al., 1996). Infine, questa

indagine suggerisce come la chirurgia possa rappresentare il mezzo maggiormente risolutivo in caso di ipertensione associata ad HC; tutti i soggetti sottoposti ad adrenalectomia erano normotesi. Tuttavia, in una significativa percentuale di persone sottoposte a surrenalectomia per neoplasia surrenalica, l'ipertensione persiste nonostante la remissione del corredo sintomatologico associato ad HC.

Nell'uomo, è stato dimostrato come l'infusione di ACTH, cortisolo o glicocorticoidi di sintesi sia in grado di causare ipertensione analogamente a quanto avviene nei soggetti con HC spontaneo, il che suggerisce che il cortisolo possa essere l'ormone maggiormente coinvolto nell'ipertensione (Danese e Aron, 1994). Nell'uomo, inoltre, la concentrazione plasmatica di cortisolo (e non di altri ormoni) è significativamente correlata all'ipertensione nei soggetti con iperadrenocorticismo spontaneo e anche i soggetti trattati con glicocorticoidi esogeni sviluppano ipertensione (Danese e Aron, 1994).

Lo sviluppo dell'ipertensione nel corso di HC dipende dalla reciproca azione di fattori che regolano il volume plasmatico, le resistenze vascolari periferiche e l'*output* cardiaco, tutti aumentati in questa patologia endocrina. Questo concorso di fattori include (Melby, 1989; Danese e Aron, 1994; Nichols, 1997; Goy-Thollot et al., 2002; Feldman e Nelson, 2004):

- a. Spostamento del sodio nello spazio extracellulare indotto dai glicocorticoidi;
- b. Incremento dell'azione dei mineralcorticoidi
- c. Aumento del tono vascolare
- d. Aumento nella secrezione di renina
- e. Attivazione del sistema renina-angiotensina
- f. Aumento di sensibilità da parte del sistema vascolare a fattori ipertensivi (catecolamine a agonisti adrenergici)
- g. Riduzione delle prostaglandine (che hanno azione vasodilatante)

h. Aumento della secrezione di mineralcorticoidi (non dalla zona glomerulare).

Attualmente, si pensa che la causa maggiormente responsabile dell'ipertensione sia la maggior sensibilità da parte del sistema vascolare a fattori ipertensivi (Ortega et al., 1996).

Le conseguenze dell'ipertensione sono numerose e includono:

cecità (per emorragie intraoculari e/o distacco retinico), fenomeni tromboembolici, ipertensione renale, proteinuria, glomerulosclerosi, ipertrofia ventricolare sinistra e insufficienza cardiaca congestizia, tromboembolismo polmonare (Littman et al., 1988; Feldman e Nelson, 2004). In molti casi l'ipertensione si risolve in seguito alla terapia per l'HC (il miglioramento può richiedere 6 mesi o più); tuttavia, in alcuni casi l'ipertensione persiste anche dopo il raggiungimento di un adeguato controllo dell'ipercortisolismo (Ortega et al., 1996; Nichols, 1997; Feldman e Nelson, 2004).

Lo sviluppo di sclerosi di arterie e arteriole potrebbe giustificare la mancata remissione dell'ipertensione; l'ipertensione cronica, nel tempo, è in grado di alterare morfologicamente arterie e arteriole attraverso una riduzione dell'elasticità e del loro lume causando, in questo modo, un aumento delle resistenze periferiche in grado di perpetuare l'ipertensione anche dopo che la causa iniziale della stessa è stata risolta (Littman et al., 1988; Ortega et al., 1996).

Nell'uomo, il rischio di persistenza dell'ipertensione è strettamente correlato al tempo intercorso tra la comparsa della malattia e l'inizio terapeutico, suggerendo come, probabilmente, sia necessario un certo intervallo temporale all'instaurarsi delle lesioni vascolari che rendono l'ipertensione irreversibile (Welbourn et al., 1971). Attualmente l'esigenza di impostare una terapia antiipertensiva nei cani affetti da HC ben controllato e con ipertensione persistente non è nota (Ortega et al., 1996);

alcuni Autori suggeriscono di impostare una terapia antiipertensiva nei cani affetti da HC con ipertensione grave, ovvero con SAP > 190 mmHg e/o Pa DAP > 130 mmHg o nel caso di persistenza dell'ipertensione nel tempo nonostante la terapia adeguata (Bertoy et al., 1995) o nel caso in cui siano presenti patologie concomitanti in grado di perpetuare e aggravare l'ipertensione (Bertoy et al., 1996).

In passato, a causa del fatto che alcuni Autori (Ortega et al., 1996) avevano svelato livelli di aldosterone più elevati sia pre- che post-stimolazione con ACTH nei cani con HC rispetto a quelli sani, si considerava l'aldosterone come uno degli elementi incriminati nella maggiore ritenzione di sodio ed acqua e, quindi, nell'ipertensione associata ad HC. Nell'uomo, il cronico eccesso sia di glicocorticoidi che di mineralcorticoidi può indurre alterazioni vascolari irreversibili e perpetuanti l'ipertensione.

In un più recente studio (Goy-Thollot et al., 2002) il 69% dei soggetti con PDH presentava SAP (Ultrasonologia Doppler) > 200 mmHg e la Pa era significativamente più alta nei soggetti con PDH non in terapia o in terapia da un tempo non superiore ai 3 mesi rispetto al gruppo di controllo (SAP media: 125 ± 4 mmHg).

I livelli di aldosterone non erano più elevati, ma addirittura più bassi nei soggetti con PDH rispetto ai sani e ciò è in disaccordo con quanto assunto da un precedente studio (Ortega et al., 1996). Il sodio, al contrario, era significativamente più elevato nei soggetti con PDH non trattato e in quelli sottoposti a terapia rispetto ai cani sani (Goy-Thollot et al., 2002) anche se, dopo 3 mesi di terapia, (e non a 10 giorni) il sodio era significativamente più basso rispetto a quello dei cani con PDH non trattati. E' importante sottolineare come, nell'uomo, la terapia con glicocorticoidi o l'HC spontaneo, si associano ad ipertensione senza che vi sia l'intervento dei mineralcorticoidi (Danese ed Aron, 1994).

L'azione simil-mineralcorticoide sembra essere imputabile alla saturazione cortisolo-indotta di un enzima (11 beta-idrossisteroide-deidrogenasi) che forma una barriera enzimatica nei tessuti che presentano recettori per i mineralcorticoidi, attraverso la metabolizzazione dei glicocorticoidi a metaboliti inattivi; l'attività mineralcorticoide, quindi, dipende dal legame del cortisolo con i recettori per l'aldosterone che si traduce in attività dei glicocorticoidi analoga all'aldosterone.

Nel caso di HC, eccetto nel caso in cui siano presenti neoplasie surrenaliche secernenti sia cortisolo che aldosterone, i livelli di aldosterone sono piuttosto bassi (Goy-Thollot et al., 2002) e ciò è imputabile all'attività mineralcorticoide posseduta dai suoi precursori (corticosterone e deossicorticosterone [DOC]). Il cortisolo aumenta così la ritenzione di sodio e acqua incrementando il volume vascolare; ciò sembra rappresentare la causa scatenante dell'ipertensione associata ad HC (Goy-Thollot et al., 2002; Smith et al., 2003).

Inoltre, la somministrazione di glicocorticoidi determina un incremento della gittata cardiaca (CO) grazie all'aumento di Phenylethanolamine-N-Methyltransferase (PNMT) (Danese e Aron, 1994).

Inducendo ipertensione, i glicocorticoidi determinano, nel distretto renale, glomerulosclerosi che si riflette clinicamente in un aumento patologico dell'escrezione proteica urinaria (con perdita che interessa anche le proteine della coagulazione). L'ipertensione, inizialmente, induce un aumento della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) a causa di ipertensione glomerulare che, nel tempo, determina sclerosi e vasospasmo delle arteriole afferenti al glomerulo e, in ultima analisi, sclerosi glomerulare (Ortega et al., 1996).

2 LA PROTEINURIA

La proteinuria rappresenta una patologica maggiore escrezione proteica urinaria (Lulich e Osborne, 1990). La nefropatie, nei nostri animali, sono spesso diagnosticate tardivamente, ovvero alla comparsa dei sintomi da insufficienza renale; ciò dipende dalla frequente mancanza di un esordio caratterizzato da segni clinici specifici e conclamati (Scarpa et al., 2004a).

E', pertanto, di rilevante importanza procedere all'analisi della proteinuria che rappresenta il segno più precoce di nefropatia (Airoldi e Campanini, 1993; Osborne et al., 1999; Scarpa et al., 2004).

2.1 La filtrazione glomerulare

Il plasma contiene circa 7g/L di proteine il cui peso molecolare, per il 99%, è superiore a 40.000 Dalton (Da). La maggior parte delle proteine urinarie è di origine plasmatica (60-70%). La proteinuria (fisiologica o patologica) rappresenta quindi, in sostanza, l'esito di due processi:

- La filtrazione glomerulare
- Il riassorbimento tubulare.

In generale, il passaggio delle molecole proteiche attraverso i capillari glomerulari diminuisce all'aumentare delle dimensioni delle proteine (valutate in base al peso molecolare: P.M.). Normalmente, le proteine con alto P.M., come le IgM (900.000 Da), non compaiono nell'ultrafiltrato in quantità rilevabili. Le albumine sono fisiologicamente presenti nell'ultrafiltrato in piccole quantità, benché il plasma ne contenga ad elevata concentrazione. Questo dipende dal loro P.M. (compreso tra 66.000 e 69.000 Da) ed, in parte, a causa della presenza di cariche negative presenti sulle pareti (che respingono le albumine che hanno medesima carica).

Il glomerulo rappresenta l'unità di filtrazione, è costituito da una rete di capillari che si ramificano e si fondono per anastomosi. La membrana capillare è costituita da cellule endoteliali, cellule epiteliali viscerali e parietali, cellule e matrice mesangiali, membrana basale e dei capillari. L'endotelio capillare è sottile e presenta numerose fenestrature. La struttura endoteliale consente il passaggio di macromolecole con peso molecolare (P.M.) pari a quello dell'albumina plasmatica (69.000 Da) o con un raggio di 1.000 Å. Tale struttura, pertanto, non rappresenta una efficace barriera alle proteine responsabili del mantenimento della pressione oncotica plasmatica, sebbene la carica negativa propria delle proteine di membrana respinga le molecole con carica negativa (inclusa l'albumina). La membrana basale glomerulare (Glomerular Basal Membrane: GBM) è costituita da fibrille di collagene e di proteoglicani, è caratterizzata dalla presenza di cariche negative che ostacolano il passaggio di macromolecole con carica negativa. Non impedisce, tuttavia, il passaggio di molecole più piccole o neutre. E' stato provato che le molecole con carica positiva o neutra vengono filtrate più rapidamente rispetto a quelle con carica negativa e ciò a prescindere dal raggio della molecola in questione. Chiaramente un danno renale può determinare la perdita di cariche negative delle GBM e, quindi, passaggio di grandi quantità di albumine. In pratica, la membrana glomerulare intatta è impermeabile a molecole con un raggio superiore a 45 Å. e di peso molecolare superiore ai 40.000 Da (Scarpa et al., 2004). Le cellule epiteliali viscerali (podociti) rivestono i capillari e sono caratterizzate da processi citoplasmatici che si estendono verso la GBM; si formano così delle fenestrature attraverso cui avviene la filtrazione (Scarpa et al., 2004).

Chiaramente, nella valutazione della funzionalità renale, è necessario anche considerare la velocità di filtrazione glomerulare (VFG o Glomerular Filtration Rate: GFR) e la pressione del flusso ematico a livello di arteriole glomerulari che condizionano il grado di filtrazione; l'entità di quest'ultima,

infatti, diminuisce al calare della VFG anche in caso di danno all'unità di filtrazione (Scarpa et al., 2004).

Pertanto, l'entità di filtrazione glomerulare è in relazione alla concentrazione plasmatica, al P.M., alla carica elettrica e alla forma delle proteine (Deen e Satvat, 1981).

In linea generale, la filtrazione glomerulare delle proteine progressivamente diminuisce all'aumentare del loro P.M. Normalmente, proteine ad elevato P.M., non compaiono nell'ultrafiltrato glomerulare in

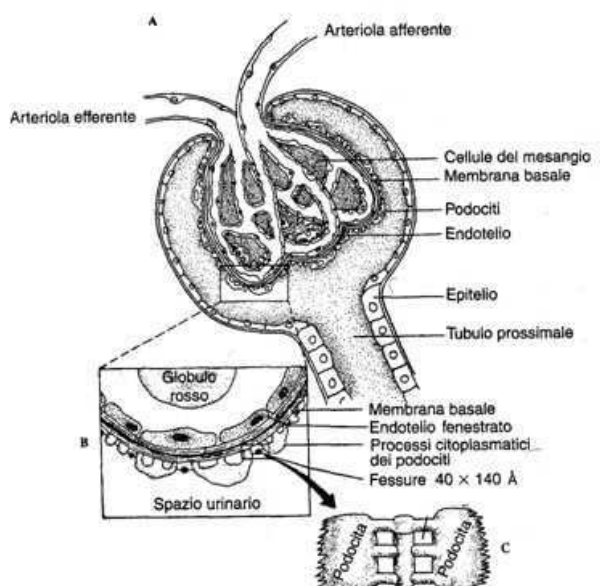


Figura 8: rappresentazione schematica del corpuscolo renale (glomerulo e capsula di Bowman). A: fiocco glomerulare invaginato all'interno della capsula glomerulare; B: strutture che operano la filtrazione glomerulare; C: ingrandimento dello strato dei podociti (ruotato di 90° per mostrare la faccia interna (modificato da Reece, 2002).

modo apprezzabile. Le albumine, presenti ad elevata concentrazione nel plasma, si rilevano solo in piccole quantità in situazioni fisiologiche a causa del loro relativamente elevato P.M. e in parte grazie alla loro carica negativa (Lulich e Osborne, 1990).

Perciò, se l'unità di filtrazione è intatta, le molecole con P.M. superiore a 69.000 Da non dovrebbero attraversarla (meno dello 0.1% di albumina è filtrata attraverso il glomerulo nell'uomo (Scarpa et al., 2004).

Proteine plasmatiche con P.M. compreso tra 1.500 e 45.000 Dalton sono soggette a filtrazione glomerulare, ma si riscontrano in quantità modesta a causa della loro relativamente scarsa concentrazione plasmatica. L'emoglobina, pur presentando basso P.M., è raramente riscontrabile nell'ultrafiltrato grazie al fatto che, usualmente, è legata all'aptoglobina che è piuttosto voluminosa. L'entità della proteinuria dipende anche dal grado di riassorbimento tubulare. L'albumina rappresenta il 40-60% delle proteine totali escrete nelle urine a causa del riassorbimento solo parziale operato dalle cellule tubulari. Al contrario, proteine con più basso P.M., sono attivamente riassorbite a livello tubulare per poi essere catabolizzate

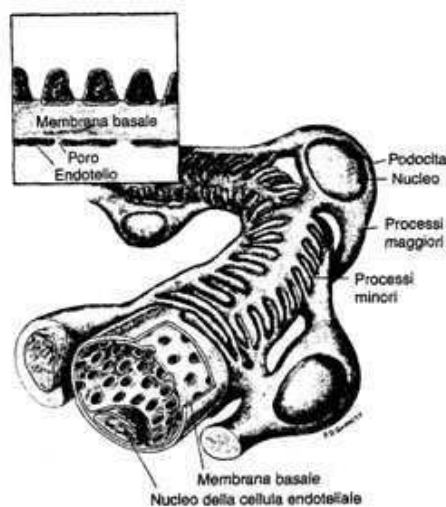


Figura 9: Ultrastruttura dell'apparato di filtrazione glomerulare (modificato da Reece, 2002)

dalle cellule del tubulo prossimale e re immesse in circolo come aminoacidi (Lulich e Osborne, 1990).

2.2 Il riassorbimento tubulare

Le proteine con P.M. inferiore a quello dell'albumina vengono filtrate dal glomerulo renale, ma riassorbite attivamente attraverso il tubulo prossimale. Tali proteine comprendono: ormoni peptidici (insulina, glucagone, paratormone ecc.), enzimi (lisozima, ribonucleasi, amilasi ecc.), frammenti di immunoglobuline (catene leggere), proteine coinvolte nella risposta immunitaria (β -microglobulina), alcune proteine della fase acuta (alfa 1 glicoproteina acida, alfa 1 antitripsina), proteine vettrici (proteina legante il retinolo), apolipoproteine (apoA1, β 2-glicoproteina 1) o

Sostanza	P.M. (Dalton) approssimativo	Presenza nell'ultrafiltrato
Acqua	18	presente
Urea	60	presente
Creatinina	113	presente
Glucosio	180	presente
β 2-microalbumina	11.800	presente
Lisozima (muramidasi)	14.400	presente
Mioglobulina	17.600	presente
Bence Jones (dimero)	22.000	presente
α 1-microglobulina	27.000	presente
α 1-glicoproteina acida	40.000	presente
Bence Jones (dimero)	44.000	presente
Amilasi	50.000	presente
Emoglobina (tetramero)	64.500	talvolta presente
Albumina	66.000	talvolta presente
Aptoglobulina	120.000	assente
Immunoglobulina G	160.000	assente
Immunoglobulina A (dimero)	300.000	assente
Fibrinogeno	400.000	assente
α 2-microglobulina	840.000	assente
Immunoglobulina M	900.000	assente

Tabella 3 Alcune proteine plasmatiche e relativi pesi molecolari incluse od escluse dal filtrato glomerulare (modificato da Osborne et al., 1999).

altre (alfa 1 microglobulina ecc.). I peptidi fino a 10.000 Da vengono scissi nel lume tubulare e riassorbiti come aminoacidi nel torrente circolatorio. Anche il riassorbimento tubulare sembra regolato da interazioni chimico fisiche tra membrana dei microvilli e proteine ed è condizionato da:

- Carica delle proteine (affinità dei gruppi cationici delle proteine filtrate per le cariche negative delle molecole che rivestono i microvilli);
- Configurazione spaziale della proteina (che ne condiziona l'assorbimento);
- Specificità di sede che determina l'assorbimento preferenziale di una proteina in un particolare segmento di tubulo.

2.3 Classificazione della proteinuria:

Si definisce proteinuria la quota di proteine presente nelle urine, anche se, comunemente, il termine viene utilizzato per definire una patologica escrezione proteica nelle urine.

La proteinuria può essere classificata in base all'aspetto patogenetico o a quello clinico; la classificazione su base eziopatogenetica distingue la proteinuria in: fisiologica, funzionale, patologica (Scarpa et al., 2004):

2.3.1 Proteinuria Fisiologica

Nell'uomo, la quota di proteine escrete fisiologicamente è circa 150 mg/24 ore. Nel cane e nel gatto l'eliminazione giornaliera dovrebbe essere < 20 mg/kg/dì. Poco ancora si sa riguardo all'influenza del contenuto proteico della dieta sull'escrezione proteica nei nostri animali in cui una patologica proteinuria si ritiene imputabile ad un danno glomerulare sul quale ancora è sconosciuto il ruolo della dieta (Scarpa et al., 2004).

2.3.2 Proteinuria Funzionale

Si tratta di un aumento nella quota di proteine escrete non dipendente da una patologia renale, ma da numerosi situazioni cliniche parafisiologiche o patologiche quali, ad esempio: esposizione al freddo, ipertermia, tremori muscolari e contrazioni muscolari associate a crisi epilettiformi, stress fisico e ad insufficienza circolatoria di varia origine, congestione venosa glomerulare (Scarpa et al., 2004). La proteinuria funzionale, tipicamente, si manifesta con transitoria e moderata albuminuria (Lulich e Osborne, 1990).

2.3.3 Proteinuria Patologica

Si osserva un'aumentata eliminazione di proteine nell'urina; è, a sua volta, distinguibile in pre-renale, renale e post-renale.

Proteinuria pre-glomerulare (o pre-renale)

Causata da patologie sistemiche pre-glomerulari che causano un aumento di concentrazione sierica di proteine; quelle che sono in grado di essere filtrate dal glomerulo renale raggiungono il tubulo in quantità superiore alla sua capacità di riassorbimento e, quindi, si osserva massiva perdita con le urine. Chiaramente si tratterà di proteine con P.M. piuttosto basso e, quindi, in grado di superare l'unità funzionale del glomerulo (es. mieloma, emoglobinuria, mioglobinuria) (Finco, 1999).

La proteinuria pre-renale può essere ulteriormente suddivisa in funzionale e da sovraccarico

- La proteinuria "funzionale" può essere associata a *stress* fisico, esercizio intenso e protratto, stati febbrili, interventi chirurgici, tremori e contrazioni muscolari (crisi epilettiche), esposizione a temperature estreme, congestione venosa renale (Lulich et al., 1996; Scarpa et al., 2004). Sebbene in queste situazioni vi sia un'alterata funzionalità renale, essa è reversibile poiché associata ad

alterazione del flusso glomerulare o ad alterata permeabilità dei capillari glomerulari.

- La proteinuria “da sovraccarico glomerulare” (o “da sovraccarico proteico”) è associata ad aumento della concentrazione proteica sierica. Si osserva ad esempio in caso di mieloma multiplo, in cani con ehrlichiosi, in seguito a somministrazione eccessiva di plasma. Anche questa rappresenta una alterazione glomerulare reversibile (Lulich e Osborne, 1990).
- La proteinuria “da sovraccarico tubulare” può essere associata ad aumentata concentrazione sierica di proteine a basso P.M. (ad esempio frammenti di immunoglobuline, mioglobina, emoglobina) oppure a riduzione dei siti di legame di alcune proteine (esempio l’aptoglobina per l’emoglobina).

Alcuni esempi di proteinuria “da sovraccarico tubulare” sono:

- L’emoglobinuria
- La mioglobinuria
- La paraproteinuria che si può osservare quando immunoglobuline (complete o loro frammenti), macroglobuline o crioglobuline, sintetizzate da cellule neoplastiche raggiungono concentrazioni plasmatiche elevate (Osborne et al., 1999).
- Proteinuria “di Bence Jones”: si tratta di piccole proteine (P.M.: 22.000-44.000 Da) identiche alle catene leggere delle immunoglobuline e possono essere osservate in pazienti affetti da disordini immunoproliferativi (mieloma multiplo) (Lulich e Osborne, 1990).

Proteinuria renale: glomerulare

Diverse sono le cause che possono indurre un’alterazione della permeabilità glomerulare dovuta ad alterazioni strutturali o ad alterazioni delle cariche di membrana; le lesioni limitate alle glicoproteine anioniche determinano una perdita selettiva di proteine anioniche quali l’albumina e

la transferrina, dando luogo ad una “proteinuria glomerulare selettiva”. Danni più severi alla membrana glomerulare son in grado di determinare il passaggio di molecole con P.M. più elevato, determinando una “proteinuria non selettiva”. La selettività della proteinuria è, perciò, in dipendenza della gravità del danno glomerulare.

Le cause di glomerulopatia includono patologie immunomediate e non immunomediate (Lulich et al., 1996).

Le cause immunomediate di danno glomerulare comprendono:

- Deposito di complessi Ag-Ac circolanti a livello sub endoteliale e mesangiale
- Fissazione a livello subepiteliale di autoanticorpi circolanti con antigeni glomerulari intrinseci
- Formazione di complessi Ag-Ac a seguito della fissazione di anticorpi diretti contro antigeni non glomerulari localizzati a livello dell’endotelio glomerulare.

Le glomerulopatie non immunomediate si osservano nelle situazioni patologiche che determinano ipertensione e iperfiltrazione glomerulare (Lulich et al., 1996).

Diverse sono le proteine che indicano la presenza di un’alterazione glomerulare. Le più rappresentative sono l’albumina (P.M. 69.000 Da), la transferrina (P.M. 90.000 Da), proteine della coagulazione come l’antitrombina III (65.000 Da), le IgG (P.M. 160.000 Da) e la β -2 macroglobulina (P.M. 850.000 Da). Nel caso di proteinuria selettiva nelle urine saranno presenti prevalentemente albumine e transferrina; se il danno è maggiore si parla di proteinuria “non selettiva”, caratterizzata anche dalla presenza di proteine con P.M. maggiore.

Proteinuria renale tubulare

Causata dalla ridotta capacità di riassorbimento da parte delle cellule tubulari prossimali. E' caratterizzata, pertanto, dalla presenza di proteine a basso peso molecolare (P.M. compreso tra 10.000 e 50.000 Da). Le cause di danno tubulare in Medicina Veterinaria sono sovrapponibili a quelle riportate in Medicina Umana ed includono: Sindrome di Fanconi, acidosi tubulare, rene policistico, intossicazione da metalli pesanti, necrosi tubulare indotta da taluni farmaci (es. tossicità da gentamicina) (Lulich et al., 1996).

Caratterizzata dalla presenza nelle urine di proteine con basso P.M.

Proteinuria renale glomerulo-tubulare

Dovuta ad alterazioni delle cariche elettriche e strutturali del glomerulo con conseguente aumento della filtrazione proteica. A causa di una contemporanea nefropatia interstiziale si associa un difetto di riassorbimento tubulare; ecco perché si osserva proteinuria sia glomerulare che tubulare. La proteinuria "mista" si rileva in caso di nefriti interstiziali e pielonefriti.

Proteinuria post-renale

In caso di infiammazioni ed emorragie delle vie urinarie discendenti o dall'apparato genitale o nel caso in cui i tessuti dell'apparato uro-genitale siano distrutti da infiammazione, neoplasia, ischemia, trauma. La proteinuria post-glomerulare in genere è associata a leucocituria, eritrocituria o entrambe (Lulich et al., 1996). E' caratterizzata dalla comparsa di proteine con P.M. > 250.000 Da e dalla presenza di un sedimento attivo. Per escludere che si tratti di proteinuria post-renale è utile valutare un campione mediante cistocentesi (Lees et al., 2005).

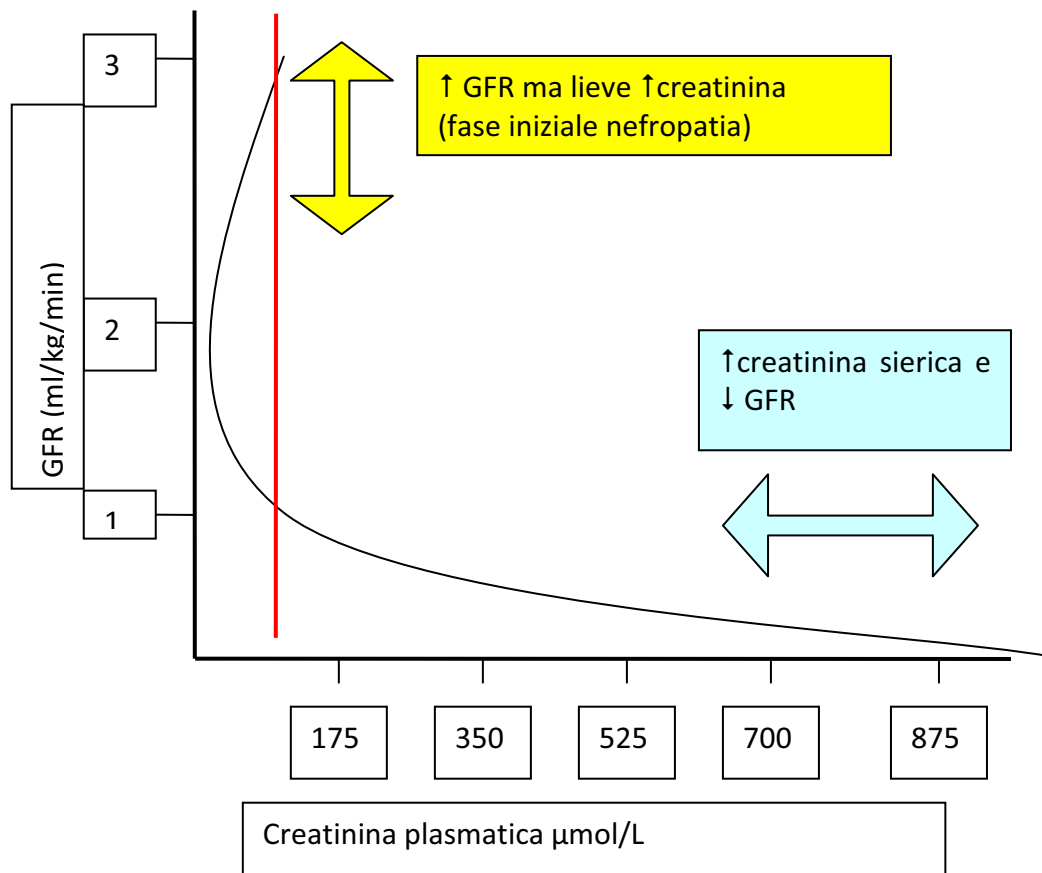


Figura 10: Relazione tra GFR (glomerular filtration rate) e creatinina plasmatica. Il grafico illustra la scarsa sensibilità della creatinina plasmatica per nella diagnosi precoce di nefropatia; (la linea rossa corrisponde al limite superiore fisiologico nel cane (circa 140 µmol/L; 1,58 mg/dl) (modificato da Elliot e Grauer, 2007).

2.4 Valutazione semiquantitativa della proteinuria

La concentrazione proteica urinaria, espressa in g/dl, è rappresentata da:

$$\text{(quantità di proteine)} \times \text{(unità di volume)}$$

mentre il contenuto proteico è costituito da:

$$\text{(volume di urina)} \times \text{(concentrazione proteica delle urine)}$$

La determinazione della concentrazione proteica urinaria fornisce un'informazione solo parziale riguardo alle reali perdite proteiche che avvengono nelle 24 ore; ciò a causa della fluttuazione del volume urinario del soggetto e a causa delle differenze del volume urinario individuali (Finco, 1999). I c.d. *test* di screening per la proteinuria si avvalgono dell'impiego di *stick* urinari; rappresentano dei *test* definiti semiquantitativi poiché non rilevano allo stesso modo tutti i tipi di proteine eventualmente escrete nelle urine (Elliot e Grauer, 2007). Le tecniche impiegate per la stima semiquantitativa della proteinuria sono:

- a. Le prove colorimetriche mediante strisce reattive
- b. Le prove turbidimetriche con acido solfo salicilico e con acido nitrico

Questi *test* si definiscono come semiquantitativi poiché hanno scarsa capacità di rilevare le globuline e le proteine di Bence Jones (Marshall e Williams, 1999; Osborne et al., 1999).

Le prove colorimetriche mediante strisce reattive

La striscia reattiva sfrutta il viraggio di colore del blu tetrabromofenolo che si verifica per contatto con le proteine (Finco, 1999). Ciò avviene grazie alla capacità dei gruppi amminici delle proteine di legarsi ad indicatori acido-base, alterandone il colore. L'entità di legame dipende dal numero di gruppi amminici liberi di ogni proteina e le albumine possiedono più gruppi liberi rispetto ad altre proteine quali globuline, emoglobina, proteine di Bence Jones e mucoproteine; per queste ultime sono necessarie concentrazioni urinarie doppie rispetto alle albumine per determinare un analogo viraggio di colore. Questa metodica è utilizzata come *screening* di base per determinare la concentrazione proteica urinaria (Osborne et al., 1999; Elliot e Grauer, 2007) ed è in grado di rilevare le proteine solo se esse si trovano nelle urine ad una concentrazione > 0.3 g/l (30 mg/dl) (Elliot e Grauer, 2007).

Si possono verificare falsi positivi se le urine hanno pH alcalino, in presenza di un sedimento attivo (piuria/ematuria e/o batteriuria), se le urine sono contaminate con sali quaternari d'ammonio o se lo *stick* viene lasciato in contatto con le urine per un tempo sufficiente a far dissolvere il "buffer" di citrato che è incorporato nel tampone (Elliot e Grauer, 2007).

Anche se si possono osservare in entrambe le specie, i falsi positivi sono ancor più frequentemente osservati nel gatto che nel cane (Elliot e Grauer, 2007).

Falsi negativi possono conseguire alla presenza di proteine di Bence Jones, nel caso di scarsa presenza di albumine e/o nel caso di urine diluite o acidificate (Elliot e Grauer, 2007).

Le prove torbidimetriche con acido solfo salicilico e con acido nitrico

La miscelazione dell'urina con ciascuno dei due acidi provoca torbidità proporzionalmente al contenuto proteico. Queste metodiche sono in grado di rilevare anche le proteine di Bence Jones e sono, pertanto, più accurate delle strisce reattive (Finco, 1999). Chiaramente, il grado di torbidità, definito da una scala che va da +1 a + 4, può essere variabile a seconda dell'operatore e del laboratorio. Utilizzando l'acido solfo salicilico (sulphosalicylic acid: SSA) si aggiunge un uguale volume di acido al 3-5% al campione di urina e si osserva il grado di torbidità. Falsi positivi sono stati osservati in urine contenenti sostanze non proteiche, mezzi di contrasto iodati, timolo (conservante), penicillina, cefalosporine e sulfisossazolo. I falsi negativi sono meno frequenti con questa metodica rispetto alla metodica che impiega la reazione colorimetrica; un'urina alcalina può invece dare un risultato falsamente negativo (Osborne et al., 1999).

La proteinuria rilevata mediante questi test semiquantitativi, da sempre viene interpretata in associazione al peso specifico (P.S.) urinario e al sedimento; in passato, infatti, nell'evenienza in cui si riscontrasse 1+ di proteinuria in associazione ad urine iperstenuriche, non si dava un

significato patologico a questo riscontro che si considerava conseguente all'elevata concentrazione urinaria. Analogamente, un risultato positivo allo stick in presenza di ematuria o leucocituria era associato ad emorragia o infiammazione del tratto urinario. In entrambe le situazioni, l'interpretazione non è corretta in quanto, considerando il limite di sensibilità dei test semiquantitativi, un risultato positivo è sempre da considerarsi patologico (eccetto in caso di falso positivo) (Elliot e Grauer, 2007).

Negli ultimi tempi (Pressler et al., 2002) è disponibile una nuova metodica semiquantitativa (Early Renal Damage: ERD[®], Heska). E' un test sensibile e immunologico che impiega anticorpi (Ab) specifici per il cane e il gatto. La metodica prevede la diluizione del campione di urine fino ad ottenere un peso specifico di 1.010. E' in grado di rilevare la concentrazione di albumine nelle urine a partire da 0.01 g/l (1.0 mg/dl) e, quindi è molto più sensibile delle altre metodiche semiquantitative (Elliot e Grauer, 2007).

2.5 Analisi quantitativa della proteinuria

Il metodo "*gold standard*" per conoscere la reale escrezione proteica urinaria sarebbe quello che prevede la raccolta delle urine nelle 24 ore, quindi la misurazione del volume e della concentrazione proteica del soggetto espressa in milligrammi di proteine nelle urine/kilogrammo di peso vivo (mg/kg); questa metodica, tuttavia, è di difficile impiego nella pratica clinica a causa della difficoltà di impiego (Elliot e Grauer, 2007).

L'impiego del rapporto urinario proteine: creatinina (U:P/C) rappresenta una valida alternativa di più semplice realizzazione alla raccolta urinaria nelle 24 ore. Anche in presenza di alterata permeabilità dei capillari glomerulari o in presenza di danno tubulare, l'entità della proteinuria non varia in modo significativo da un giorno all'altro. La variabile è rappresentata dal volume urinario. Analogamente alla proteinuria, la produzione di creatinina è costante ed è filtrata dal glomerulo in assenza di

una significativa secrezione o riassorbimento tubulare; pertanto, la concentrazione di creatinina nelle urine riflette la concentrazione e, quindi, il volume urinario. Dividendo la concentrazione proteica urinaria (mg/dl) per la concentrazione urinaria della creatinina (mg/dl), pertanto, si annulla la variabile determinata dal volume urinario (Elliot e Grauer, 2007):

2.5.1 U:P/C

Questo rapporto si può calcolare su qualunque campione urinario; tuttavia, l'ideale è rappresentato da un campione del mattino, dopo confinamento notturno del soggetto, al fine di ottenere un campione che si basa sulle urine prodotte in un tempo il più possibile prolungato (Elliot e Grauer, 2007). Diversi sono gli studi effettuati ad oggi al fine di definire la fisiologica escrezione proteica urinaria:

Secondo lo studio di Grauer e collaboratori la normale escrezione proteica nel cane era variabile da 0.6 a 5.1 mg/kg/die (Grauer et al., 1985); questi valori corrispondevano ad un valore di U:P/C \leq 0.2-0.3. Questo valore è più basso di quello riportato da altri (McCaw et al., 1985) secondo cui la escrezione proteica di cani sani di età compresa tra 6 mesi e 10 anni era compresa tra 1.8 e 22.4 mg/kg/die. Mediante metodica dell'acido tricloroacetico ponceau-S per la misurazione proteica, White e collaboratori hanno rilevato un'escrezione proteica massima di 11.7 mg/kg/die (White et al., 1984). Su 29 cani sani variabili per sesso ed età è riportata una proteinuria compresa tra 2.7 e 23.3 mg/kg/dì (Biewenga et al., 1982). In linea generale si afferma che, utilizzando la tecnica del blu brillante Coomassie o il metodo dell'acido tricloroacetico ponceau-S, (Lulich e Osborne, 1990) una concentrazione proteica urinaria > di 20 mg/kg/die si considera anormale e corrisponde ad un valore di U:P/C compreso tra 0.67 e 0.96. Fino a qualche anno fa si considerava non patologico un valore di U:P/C < 1; da studi più recenti, è opinione comune considerare fisiologico un valore di U:P/C < 0.5 (Lees et al., 2005).

Gli studi a regressione lineare hanno dimostrato che, moltiplicando U:P/C per 20 (metodo blu brillante Coomassie) o per 30 (metodo acido tricloroacetico ponceau-S), si ottiene un valore approssimativo dell'escrezione proteica urinaria delle 24 ore (Grauer e Di Bartola, 2002).

U:P/C è un parametro prognostico utilizzato nelle nefropatie ed una diminuzione dello stesso è considerato fattore prognostico positivo. Tuttavia, non sempre, ad un calo di U:P/C, corrisponde un miglioramento della funzionalità glomerulare; infatti, se associato ad un parallelo aumento della creatinina sierica, può indicare un cambiamento della funzionalità del glomerulo di tipo irreversibile (es. glomerulosclerosi) (Lulich et al., 1996).

Diversi sono i fattori in grado di influenzare in modo variabilmente significativo il valore di U:P/C (Krawiec, 2002):

1. Esercizio fisico
2. Dieta
3. Sesso
4. Metodo di raccolta
5. Momento del prelievo del campione
6. Infiammazioni
7. Emorragie
8. Farmaci

Esercizio fisico

Nell'uomo uno sforzo fisico intenso può causare un aumento transitorio dell'escrezione proteica urinaria; nel cane poco ancora si sa a riguardo e i risultati dagli studi ad oggi effettuati sono variabili; pare che la corsa non sia in grado di aumentare la proteinuria (Gary et al., 2004), mentre il nuoto è stato in grado di determinare un lieve incremento della proteinuria (Joles et al., 1984).

Dieta

Non è stato rilevato alcun effetto dell'apporto proteico sul rapporto U:P/C nel cane; il valore non sembra essere soggetto a cambiamenti in relazione al digiuno o alla somministrazione del pasto al soggetto (Di Bartola, 2002).

Sesso:

Le differenze di sesso causano un aumento nell'escrezione proteica, sia nel cane che nel gatto, che si osserva nei maschi se il campione viene raccolto per minzione spontanea; ciò non si avvera se le urine vengono prelevate mediante cistocentesi; è verosimile che il maggior contenuto proteico urinario nei maschi in urine raccolte per caduta dipenda dalla presenza di proteine che originano dalle vie urinarie inferiori (Finco, 1999).

Metodica di raccolta

non sembra influenzare la precisione di U:P/C

Momento del prelievo del campione

Alcuni Autori sostengono che vi sia una buona correlazione tra U:P/C e proteinuria rilevata mediante stima nelle 24 ore a prescindere dal momento di raccolta del campione (White et al., 1984). Altri consigliano, comunque, la raccolta delle urine del mattino che rappresentano un campione più ampio e accurato (Elliot e Grauer, 2007).

Infiammazioni

Le infezioni urinarie sono in grado di causare un aumento di U:P/C; tale aumento non è direttamente proporzionale al numero di eritrociti/leucociti riscontabili nelle urine (Finco, 1999).

Emorragie

La presenza di ematuria causa un aumento di U:P/C e può essere anche conseguente ad errata tecnica di prelievo

Farmaci

La terapia con glicocorticoidi (e l'HC spontaneo) determinano un aumento della proteinuria (Waters et al., 1997; Di Bartola, 2002).

Nel cane, una proteinuria renale persistente con $U:P/C \geq 2$ è, in genere, dovuta a danno glomerulare. Il riscontro di $U:P/C \geq 0.5$ in tre o più campioni ottenuti a distanza di due settimane o più di distanza l'uno dall'altro indica la presenza di proteinuria renale persistente e non può essere attribuito a cause prerenali o post-renali (Lees et al., 2005).

Nel cane con insufficienza renale cronica (IRC o CRF: Cronic Renal Failure) e valore iniziale di $U:P/C \geq 1$ aumenta il rischio di morbidità e mortalità (Jacob et al., 2005). La proteinuria può determinare la progressione della nefropatia mediante diversi meccanismi:

L'eccesso di proteine o di sostanze ad esse legate nell'ultrafiltrato determina un danno tubulare; l'eccesso proteico si accumula dapprima nel lume del tubulo prossimale e, dopo endocitosi, nelle cellule epiteliali tubulari contribuendo all'insulto tubulo-interstiziale. Le sostanze lipidiche legate alle proteine (lipoproteine) vengono liberate dopo endocitosi proteica ed esercitano un effetto chemiotattico e pro infiammatorio perpetuando il danno renale (Jacob et al., 2005). Ecco perché l'analisi urinaria dovrebbe essere compresa nelle analisi effettuate di *routine* nel cane e nel gatto (Lees et al., 2005). Nell'impiego dei metodi semiquantitativi, sia che si utilizzi il *test* turbidimetrico con acido solfosalicilico (SSA) sia che si impieghi lo *stick* colorimetrico (comunque meno specifico e sensibile) è necessario seguire le seguenti linee guida (Lees et al., 2005):

- a. Se si osserva una reazione francamente positiva ($\geq 1+$) è necessario procedere alla valutazione di $U:P/C$ immediatamente o dopo un'ulteriore risultato positivo ottenuto con *stick* urinario dopo 2-4 settimane (persistente proteinuria);

- b. Nel caso di un risultato debolmente positivo allo *stick* (tracce proteine): è necessario ripetere la medesima analisi dopo 2-4 settimane e procedere alla valutazione di U:P/C se di nuovo positivo al test semiquantitativo;
- c. In caso di reazione negativa allo *stick*: si può escludere la presenza di proteinuria, ma non si può escludere la presenza di microalbuminuria (quota proteica non rilevabile con metodiche semiquantitative).

Nel caso di proteinuria persistente, è opportuno conoscerne l'origine mediante analisi qualitativa della proteinuria che si effettua mediante frazionamento elettroforetico ed è volta all'identificazione dei principali *marker* proteici e degli indici di selettività glomerulare (Umbreit e Wiedemann, 2000; Zanatta et al., 2002; Scarpa et al., 2004).

In Medicina Umana vengono già da un po' di tempo, utilizzate tecniche elettroforetiche che si basano sulla separazione delle proteine in base al loro peso molecolare su substrati quali gel di poliacrilamide (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE*) o su agarosio (*Sodium Dodecyl Sulphate-Agarose Gel Electrophoresis: SDS-AGE*). Ciò sta assumendo un importante significato prognostico e terapeutico anche in Medicina Veterinaria (Scarpa et al., 2004).

2.6 Analisi qualitativa della proteinuria

2.6.1 Immunodiffusione

Si tratta di una metodica di semplice esecuzione e, quindi, facilmente realizzabile nella pratica ambulatoriale. Viene allestita una piastra di agarosio sulla quale si ricavano pozzetti posti ad esagono. Nel pozzetto centrale si depongono pochi μ l di urina da esaminare. Nei pozzetti periferici vengono posti anticorpi monospecifici delle proteine che si intendono rilevare. La piastra viene posta in incubazione per 24 ore a

temperatura ambiente; infine si esamina la piastra per rilevare eventuali linee di precipitazione ottenute per diffusione dei reagenti (complessi Ag-Ac). La tecnica è semplice, ma purtroppo i *kits* disponibili offrono Ac di derivazione umana che non garantiscono una reazione crociata con le proteine del cane (Scarpa et al., 2004).

2.6.2 Tecniche Elettroforetiche

In base alle caratteristiche dei componenti (substrato, tamponi, coloranti) si distinguono i vari tipi di elettroforesi:

- Migrazione in funzione della carica elettrica (elettroforesi zonale su acetato di cellulosa o di agarosio)
- Migrazione in base al punto isoelettrico (isoelettrofocalizzazione)
- Migrazione in base al peso molecolare: SDS-PAGE (poliacrilamide) o SDS-AGE (agarosio)

Elettroforesi zonale (EF)

Si effettua su supporti solidi: l'acetato o il nitrato di cellulosa e l'agarosio sono i più utilizzati. La separazione su questi supporti avviene in primo luogo in base alla carica elettrica delle proteine. Questa tecnica presenta alcune difficoltà:

- La minore concentrazione proteica urinaria rispetto a quella sierica non permette l'utilizzo delle metodiche utilizzate per l'elettroforesi sierica (falsi negativi);
- Difficoltà nella lettura dei tracciati elettroforetici che può essere visuale (*trans* illuminazione) o densitometrica (le immagini vengono importate attraverso densitometri o scanner che traducono la densità del colore o i pixel in picchi fino a formare grafici. In entrambi i casi, però, per identificare le bande proteiche è necessario conoscerne la posizione e la morfologia; questa è nota

per le proteine sieriche, ma non per quelle urinarie (peraltro variabili a seconda della localizzazione del danno renale).

Per ovviare a questi inconvenienti esistono 3 possibilità:

- Concentrazione del campione
- Utilizzo di coloranti ad alta sensibilità
- Immunofissazione

Concentrazione del campione

Mediante concentrazione del campione è possibile effettuare una parallela lettura delle proteine sieriche ed urinarie al fine di confrontare il tracciato sensitometrico plasmatico ed urinario ottenendo, in questo modo, un'indicazione riguardo al pattern di proteinuria presente. Tuttavia, durante la fase di preparazione del campione si possono perdere alcune proteine determinando, quindi, un'alterazione del reale tracciato elettroforetico (Scarpa et al., 2004).

Utilizzo di coloranti ad alta sensibilità

Utilizzando coloranti ad elevata sensibilità è possibile analizzare campioni urinari non concentrati; a seconda del tipo di substrato e di colorante utilizzato si potrà ricorrere ad una lettura visuale o densitometrica. La lettura densitometrica consente solo la distinzione sommaria dei diversi *pattern* di proteinuria per due motivi. Primo perché nella stessa area di migrazione possono coesistere proteine di diverso P.M. che rappresentano diverse sedi di lesioni. Secondo perché alcune proteine formano bande sfumate e non nitide, la cui lettura sarà sottostimata e difficoltosa (ad esempio l' alfa 1 microglobulina, *marker* tubulare, si presenta come una banda sfumata lungo tutta l'area alfa 1 e viene ad essere sovrapposta dalla alfa 1-antitripsina che, al contrario, forma una banda nitida e ha P.M. maggiore. Con questa metodica sarà pertanto impossibile individuare i singoli *marker* proteici. Sarà possibile solo distinguere una proteinuria glomerulare selettiva, non selettiva e tubulare, mentre sarà difficile

distinguere la proteinuria fisiologica e quella mista. Anche l'interpretazione visiva del tracciato può non essere accurata a causa del fatto che, in Medicina Veterinaria, non esiste un tracciato di riferimento. In Medicina Umana i riferimenti sono stati definiti attraverso l'immunofissazione.

Immunofissazione

Mediante Immunofissazione il medesimo campione viene fatto migrare più volte su un supporto di cellulosa o agarosio. Dopo separazione elettroforetica, una "corsa" viene fissata e colorata ed utilizzata come riferimento, mentre le altre verranno poste a contatto con Ac monospecifici. Gli Ac mirano formando complessi Ag-Ac insolubili. Durante le fasi successive di lavaggio, nel gel permarranno solo questi complessi che, colorati, permarranno come bande. Le proteine presenti saranno individuabili mediante confronto con la "corsa" di riferimento. Si tratta di una metodica ad elevata sensibilità e specificità; il limite è determinato dal fatto che, in commercio, non siano disponibili Ac specie-specifici (Scarpa et al., 2004).

SDS-PAGE

Attraverso questa metodica le proteine vengono separate in base al loro peso molecolare (P.M.). Si tratta di una metodica altamente sensibile (0.1-0.5 µg proteina/campione per la colorazione con blue Coomassie e 1-10 ng di proteina/campione per il Silver Stain) e non richiede, perciò, la concentrazione del campione. Rileva con maggiore accuratezza proteine a basso P.M. e offre una stima dettagliata del *pattern* proteico nelle urine. I gel impiegati sono costituiti da polimeri di acrilamide e bis acrilamide (poliacrilamide) legati tra loro a formare un fine reticolo tridimensionale all'interno del quale migreranno e si separeranno le proteine. E' possibile ottenere gel con pori di dimensioni diverse variando le concentrazioni dei monomeri. La scelta delle dimensioni dei pori è in relazione allo scopo prefisso: se si intende separare proteine in caso di proteinuria glomerulare

verranno usati gel con pori ampi; nel caso di proteinuria tubulare le dimensioni dei pori dovranno essere inferiori. La soluzione più indicata è quella di impiegare gel a gradiente di concentrazione nei quali, durante la migrazione, ogni molecola si ferma a livello del “poro limite” caratterizzato da un diametro inferiore a quello della molecola stessa. I gel a gradiente di concentrazione garantiscono una buona separazione elettroforetica di proteine con P.M. compreso tra 10.000 e 250.000 Dalton e, di conseguenza, una visione complessiva del pattern di proteinuria (Scarpa et al., 2004).

Per eliminare del tutto l’influenza sulla migrazione delle cariche elettriche proprie delle proteine, i campioni vengono addizionati di sodiododecilsolfato (SDS). E’ un detergente anionico che denatura le proteine aprendole e le lega in una precisa proporzione (una molecola ogni due residui aminoacidici). Poiché ogni molecola di SDS fornisce una carica negativa, il rapporto carica/massa risulterà simile per tutte le proteine che avranno le stesse modalità di migrazione determinata solo a seconda della massa molecolare. Durante le migrazioni, i campioni vengono fatti correre parallelamente a standard contenenti proteine a P.M. noto che avranno la funzione di riferimento per l’interpretazione dei pattern in esame. La lettura è visiva e si basa sulla valutazione dell’intensità colorimetrica della banda esaminata (direttamente proporzionale alla concentrazione).

La proteinuria viene così ad essere classificata in base al *pattern* proteico (Bazzi et al., 1997a):

- Fisiologico (da 70 kDa): sola presenza della banda delle albumine;
- Glomerulare puro (da 150 kDa): presenza di proteine di peso molecolare medio (albumina e transferrina) ed elevato (soprattutto immunoglobuline di 150 kDa);
- Misto con proteine di basso P.M. (Low Molecular Weight: LMW), uguale o superiore a 23 kDa (da 23 kDa);

- Misto con proteine di 10-20 kDa (da 10 kDa).

La interpretazione solamente visiva dell' SDS-PAGE può non essere del tutto accurata a causa della possibile presenza di proteine a P.M. sovrapponibile e a causa dell'aumento dell'1-2% del P.M. indotto dalla colorazione. L'acquisizione di immagini tramite *scanner* o densitometri, l'utilizzo di *software* di analisi per elettroforesi monodimensionale, l'impostazione corretta dei dati relativi alle bande proteiche degli *standard* utilizzati (P.M. e concentrazione noti) e l'elaborazione dei dati attraverso particolari algoritmi, è possibile ricavare con maggiore precisione i P.M. e le concentrazioni relativi alle bande proteiche presenti nei campioni analizzati. Ciò consente, con buona approssimazione, di individuare e quantificare i principali marker (Scarpa et al., 2004).

Nonostante la biopsia renale rappresenti il metodo più accurato per identificare la natura e la sede del danno renale, in uno studio che ha comparato l'elettroforesi mediante l' SDS-AGE e biopsia renale, è emerso che l' SDS-AGE fornisce un mezzo non invasivo che offre una sensibilità sovrapponibile ai risultati ottenuti mediante biopsia renale (100% in caso di lesioni glomerulari, 92.6% nel caso di lesioni tubulo interstiziali) (Zini et al., 2003). La specificità (falsi positivi) è risultata, al contrario, inferiore (40% per lesioni glomerulari, 62.5% per lesioni tubulo interstiziali).

In uno studio effettuato su 28 tra cani e gatti (Zanatta et al., 2002), confrontando SDS-Age e istologia renale, è emersa una buona corrispondenza tra metodica invasiva e non, soprattutto nel caso in cui il prelievo bioptico renale era praticato nell'ambito dell'esame autoptico; maggiore discordanza era presente tra SDS-AGE ed esame istologico effettuato su campione ottenuto mediante biopsia renale in vivo. Tuttavia, nonostante la biopsia rappresenti il "*gold standard*" per evidenziare la natura delle lesioni e quindi per definire la prognosi del soggetto, l'elettroforesi per P.M. risulta essere un mezzo utile nel monitoraggio del

paziente nefropatico e nella valutazione della risposta terapeutica, analogamente a quanto avviene in Medicina Umana (Zanatta et al., 2002).

2.7 Microalbuminuria (MA)

Rappresenta la concentrazione proteica non rilevabile attraverso le comuni metodiche semiquantitative e quantitative impiegate fino ad oggi; in Medicina Umana, l'escrezione proteica fisiologica della popolazione sana è consistentemente più basso rispetto al valore minimo rilevabile mediante le tecniche tradizionali; pertanto, in base a questo riscontro, è stato definito un nuovo intervallo di valori definito "microproteinuria" (Airoldi e Campanini, 1993). Nell'uomo la microalbuminuria rappresenta un'importante *marker* precoce di danno renale, con particolare riferimento al paziente diabetico. La notevole prevalenza del diabete mellito e la lunga aspettativa di vita dei soggetti malati nei paesi economicamente sviluppati, fanno della nefropatia diabetica la causa più comune di insufficienza renale cronica (IRC) (Airoldi e Campanini, 1993). Sia nel diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) che nel diabete mellito non-insulino dipendente (NIDDM), l'incidenza della microalbuminuria (MA) aumenta proporzionalmente alla durata della patologia, raggiungendo il 30% entro circa 10 anni dall'esordio (Airoldi e Campanini, 1993). Circa l'80% dei diabetici microalbuminurici sviluppa una nefropatia conclamata con macroalbuminuria nei 6-14 anni successivi allo sviluppo di MA, contro il solo 4% dei diabetici non MA (Airoldi e Campanini, 1993). La comparsa di MA aumenta, pertanto, il rischio di sviluppare una nefropatia conclamata di 20 volte sia nell'IDDM che nel NIDDM. L'evoluzione verso la nefropatia è variabile in ordine di tempo, influenzata da uno scarso controllo glicemico del paziente e ancora reversibile mediante opportune misure terapeutiche, mentre la nefropatia conclamata è meno influenzabile dalle misure preventive (terapia insulinica o dieta). Anche il controllo della pressione arteriosa (PA) e dell'apporto proteico con la dieta sono in grado di

modulare la progressione della nefropatia. L'alterazione iniziale a carico del glomerulo renale sarebbe un aumento della velocità di filtrazione (VFG), ma l'elemento patogenetico determinante è una dilatazione delle arteriole afferenti al glomerulo la cui causa è ancora non nota. Un aspetto critico nel determinare MA sarebbe l'ipertensione glomerulare in grado di determinare alterazioni strutturali potenzialmente progressive (Airoidi e Campanini, 1993). Tra le alterazioni, le più precoci interessano probabilmente la componente mucopolisaccaridica e proteica della membrana basale glomerulare. In particolare, una ridotta ed alterata biosintesi di proteoglicani eventualmente associata ad abnorme glicosilazione delle proteine strutturali, comporta la perdita di parte delle cariche elettriche negative dei pori; ne consegue un graduale e selettivo aumento della permeabilità alle molecole anioniche, quali l'albumina. Il superamento del tasso di escrezione urinaria di albumina (*Albumin Excretion Rate: AER* o *Urinary Albumin Excretion: UAE*) di 26 mg/die corrisponde alla comparsa di microalbuminuria, compresa tra l'albuminuria fisiologica e la macroalbuminuria (26-300 mg/die). Nel tempo le alterazioni a carico della membrana basale del glomerulo diventano più gravi e comportano una maggiore escrezione proteica meno selettiva a causa di aumento dei pori; ne deriva un calo della superficie totale di filtrazione (e conseguente diminuzione di AER) e aumento di permeabilità con passaggio anche di macromolecole neutre. La Pa aumenta progressivamente aggravando l'ipertensione glomerulare e, quindi, promuovendo la progressione del danno renale fino alla nefropatia conclamata (Airoidi e Campanini, 1993).

In uno studio che ha coinvolto un'ampia popolazione umana (Agewall et al., 1997) è stata valutata l'utilità della microalbuminuria come valore predittivo di mortalità per disturbi cardiovascolari in pazienti affetti da ipertensione associata o meno a DM.; in generale, nella popolazione esaminata il riscontro di MA nei pazienti ipertesi riduce l'aspettativa di vita

approssimativamente del 30 – 40%. Il riscontro di macroproteinuria (proteinuria) è associata a rischio di comparsa entro 3 anni di complicanze cardiovascolari nell'uomo iperteso (Agewall et al., 1997).

La presenza di MA, nell'uomo, è pertanto un valore predittivo di sviluppo di nefropatia conclamata che si manifesta in più del 30% dei pazienti con IDDM e in circa il 25% dei pazienti con NIDDM nel corso di 5-10 anni dalla comparsa di MA (Viberti et al., 1982; Bakker et al., 1999). Il rischio di sviluppare complicanze cardiovascolari, in caso sia presente MA, aumenta di 3-8 volte nei pazienti affetti da IDDM e di 2-4 volte in quelli con NIDDM (Bakker, 1999).

Nel corso della nefropatia, la fase caratterizzata da MA (20-200 µg/min) è ancora reversibile se si attuano le adeguate misure terapeutiche atte a rallentarne se non ad arrestarne la progressione (Viberti et al., 1982; Bakker, 1999).

Il riscontro di MA, nell'uomo, è associato, oltre che a danno glomerulare, anche a patologie sistemiche (come, ad esempio, stati infiammatori) in cui si verifica il passaggio di proteine attraverso l'endotelio e successivo riscontro nelle urine. La microalbuminuria può essere misurata mediante diverse metodiche quali: misurazione dell'escrezione di albumine nelle 24 ore, in un unico campione, o mediante misurazione del rapporto U:A/C; quest'ultimo sembra essere più accurato, nell'uomo, della sola albuminuria, nonostante il tasso di escrezione della creatinina sia influenzato dal sesso (minore nel sesso femminile) e dall'età (diminuisce all'aumentare dell'età) (Bakker, 1999). Nel gatto, la misurazione semiquantitativa di microalbuminuria e U:A/C si sovrappongono e, nel cane, poiché l'escrezione di creatinina non è influenzata dal sesso del soggetto, U:A/C è più accurato della sola stima della microalbuminuria (Whittemore et al., 2006).

La microalbuminuria, rispetto alla proteinuria mediante *stick* urinario o all' U:P/C è caratterizzata da una maggiore sensibilità nel rilevare albumine in bassa concentrazione nelle urine e da una maggiore specificità a causa di una minor influenza da parte di fattori quali: esercizio fisico, infiammazione delle vie urinarie, ematuria.

In uno studio su 408 cani (Whittemore et al., 2006) è stata valutata la microalbuminuria mediante *test* semiquantitativo (MALB_E) e mediante *test* quantitativo (MALB_Q). Le urine sono state raccolte mediante varie metodiche ed ogni campione urinario è stato portato ad un peso specifico di 1.010 mediante aggiunta di acqua distillata. La metodica semiquantitativa sfrutta una reazione colormetrica. Per quanto riguarda la misurazione quantitativa (MALB_Q), si tratta di una metodica immunoturbidimetrica in cui il risultato si ottiene in seguito ad agglutinazione causata dalla reazione tra anticorpi policlonali anti-albumina canina e albumina del campione. La concentrazione di albumina nel campione viene letta come incremento di assorbanza.

In questo studio MALB_E e MALB_Q ≥ 1 mg/dl erano considerati positivi. Per U:A/C il *cutoff* fissato era 100-200 mg/g. Il *cutoff* per U:P/C era ≥ 0.1 e ≥ 0.5. Negli animali con neoplasia era presente MA; ciò può rappresentare un aiuto diagnostico nel caso di neoplasie che, tipicamente, non determinano alterazioni alle comuni indagini ematobiochimiche eseguite di *routine* (Whittemore et al., 2006). In base al *cutoff* definito in questa indagine (pari a U:A/C₁₀₀ -U:A/C₂₀₀) U:A/C non ha fornito una buona sensibilità nell'individuare patologie sistemiche occulte nei cani che non presentavano proteinuria mediante impiego di *stick* urinari; MALB_E e MALB_Q erano dotate di migliore sensibilità e specificità.

Nell'uomo il range di riferimento per la MA è, con una diuresi normale, di 20-200 µg/min (Pressler et al., 2002), secondo altri Autori 20-300 mg/L (Sawicki et al., 1989), 30-200 mg/L (Abid et al., 2001) o di 30-300 mg/L

(Bonfanti, 2003) o 30-300 mg/die (De Jong et al., 2007; Sarafidis, 2007). Generalmente, si considerano microalbuminurici i soggetti con escrezione albuminica pari a 20-200 µg/min (Mogensen, 1995).

La MA può essere valutata, nell'uomo, mediante la tecnica semiquantitativa che impiega lo *stick* urinario (Abid et al., 2001).

Nell'essere umano affetto da DM la MA deve essere monitorata congiuntamente alla misurazione della Pa e alla valutazione periodica della creatinina sierica, ovviamente in associazione al monitoraggio della glicemia del paziente (emoglobina glicosilata). Nei pazienti con MA, spesso è presente ipertensione arteriosa che deve essere controllata mediante terapia antiipertensiva con ACE inibitori che preservano la GFR (Glomerular Filtration Rate) (Mogensen, 1995).

La MA trova anche impiego per la valutazione prognostica di diverse patologie sistemiche quali:

- Insufficienza respiratoria acuta
- Sindrome della disfunzione multi organica
- Gravi malattie sistemiche
- Malattie neoplastiche
- Patologie cardiovascolari

E' utilizzata come *marker* prognostico nell'uomo affetto da numerose patologie; nel caso di neoplasia polmonare il riscontro di MA ha una prognosi negativa, rappresenta un mezzo per il monitoraggio del paziente affetto da ipertensione sistemica, rappresenta un *marker* prognostico negativo di rischio di complicanze cardiovascolari, ad esempio nei cardiopatici. E' associata a quadri infiammatori acuti che causano un'aumentata permeabilità vascolare e si osserva, precocemente, in caso di sepsi. Aumenta rapidamente nel corso di interventi chirurgici e l'entità è direttamente proporzionale all'insulto tissutale, ma anche in caso di ischemia o trauma. Rappresenta un valido e precoce indice di insulto

organico ed è quindi un elemento utile ad individuare i pazienti a rischio in varie condizioni patologiche (Abid et al., 2001).

Al di là dei pazienti affetti da DM e nefropatia, in uno studio epidemiologico è emersa una certa percentuale di soggetti apparentemente sani che presentavano macroalbuminuria; ciò assume grande importanza al fine di rilevare i pazienti a rischio di sviluppo di nefropatia e al fine di rallentare la progressione del danno renale attraverso terapie nefro-protettive (De Jong et al., 2007). La presenza di macroalbuminuria si associa ad un rischio elevato di sviluppare alterazioni cardiovascolari mortali; nei soggetti con IDDM, il rischio mortale di disturbi cardiovascolari aumenta di circa 3 volte nei pazienti con macroalbuminuria, contro un rischio di 1.9 volte nei pazienti che presentavano solo microalbuminuria. Il calo nell'escrezione urinaria di albumina nel giro di 6 mesi dall'inizio della terapia si associa ad una migliore prognosi e, quindi, ad un minore rischio di disturbi cardiovascolari (De Jong et al., 2007). Analogamente, anche la microalbuminuria (30-300 mg/die) pone a rischio di nefropatia progressiva e rischio cardiovascolare; i soggetti microalbuminurici presentano un rischio pari a 1.3-1.5 volte di comparsa di disturbi cardiovascolari e infarto miocardico (De Jong et al., 2007).

In definitiva, sia la macroalbuminuria, che la microalbuminuria, rappresentano alterazioni che si associano ad elevato rischio di sviluppare le medesime complicazioni (disturbi cardio-vascolari e nefropatia). Nello specifico, però, la macroalbuminuria riflette la presenza di un danno glomerulare, mentre la microalbuminuria si accompagna all'esistenza di un più generalizzato danno endoteliale; pertanto, la macroalbuminuria rappresenta un valore predittivo di nefropatia, mentre la microalbuminuria rappresenta un fattore di rischio associato a disturbi cardiovascolari (De Jong et al., 2007) anche se tutto ciò potrebbe essere relativo alla variabile tempo, ovvero, la macroalbuminuria presuppone già la presenza di fibrosi

tubulointerstiziale e, quindi, in tempi più rapidi sfocia in un progressivo deterioramento della funzionalità renale (De Jong et al., 2007).

Per quanto riguarda l'impiego del *test* semiquantitativo rapido mediante *stick* per la MA, nel cane è stato utilizzato quello formulato per l'uomo (Pressler et al., 2002), ma non ha dato risultati soddisfacenti.

In uno studio che riguarda la prevalenza della MA nel cane (Jensen et al., 2001), sono state studiate 2 popolazioni:

- Una popolazione di cani sani (n. 86)
- Una popolazione di cani portati in visita per controlli o disturbi di varia natura (n. 159)

La microalbuminuria (MA), rilevata mediante metodica ELISA e definita come la presenza di albumine nelle urine compresa tra 1.0 e 30.0 mg/dL era presente in 16/86 soggetti (19%) nella popolazione sana. Nella seconda popolazione in esame su 112 cani negativi allo *stick* urinario, 51/112 (46%) erano microalbuminurici. Inoltre, 19/80 (24%) dei soggetti con albumina urinaria < 1 mg/dL erano positivi al test urinario mediante *stick* (Jensen et al., 2001). La prevalenza della MA è stata anche indagata in una colonia di cani (Soft Coated Wheaten Terriers: SCWT) predisposti geneticamente a sviluppare glomerulopatia (Vaden et al., 2001). Lo studio (longitudinale) ha incluso 2 popolazioni:

- Nove cani di razza SCWT
- Otto cani SCWT incrociati con beagle

La MA è stata misurata mediante metodica ELISA; 13/17 (76%) presentavano MA in uno o più campioni. In tutti i soggetti la concentrazione di albumina nell'urina aumentava proporzionalmente all'età. Tre su tredici cani con MA (23%) hanno sviluppato, nel tempo, macroalbuminuria (> 30 mg/dL). U:P/C > 0.5 è stato rilevato in 3/13 cani (23%) con MA, ma solo 2/3 presentavano macroalbuminuria. In questi due soggetti, microalbuminuria e macroalbuminuria sono comparsi

simultaneamente; nell'altro soggetto, la MA precedeva di un anno la comparsa di macroalbuminuria. Questo studio mostra come la prevalenza di MA sia elevata in razze geneticamente predisposte a nefropatia e loro incroci se si confrontano i risultati ottenuti da popolazioni sane o affette da altre varie patologie (Vaden et al., 2001).

Analogamente a quanto si osserva in Medicina Umana, anche nel cane, la MA è associata a diverse patologie o situazioni patologiche (Pressler et al., 2001) quali: ipertensione, neoplasia, disturbi cardiovascolari, soggetti affetti da varie e gravi patologie di diversa natura, infezioni sistemiche. Nell'uomo l'esercizio fisico può causare un lieve e transitorio aumento dell'escrezione proteica urinaria. I fattori implicati, nell'uomo, includono un calo del flusso sanguigno a livello renale e un aumentata attività della renina plasmatica. Nel cane (Gary et al., 2004), utilizzando una metodica ELISA semiquantitativa e una metodica quantitativa (E.R.D.[®]-*screen test*) e monitorando più campioni prima, durante, subito dopo e ad una certa distanza dall'esercizio fisico (corsa su *treadmill*) nessun soggetto mostrava MA post esercizio. Nei soggetti che presentavano MA, essa era presente anche prima dell'esercizio e non era soggetta ad aumento in seguito allo sforzo.

Nel cane, il flusso renale rimane invariato durante la corsa, ma diminuisce durante il nuoto (Joles et al., 1984). Pertanto, il nuoto si rende responsabile della comparsa di un'aumentata escrezione proteica che è ancor più pronunciata nei cani splenectomizzati (Joles et al., 1984). Poiché i cani sottoposti a corsa su *treadmill* mostrano un più lieve aumento dell'ematocrito e una minore concentrazione di catecolamine rispetto ai cani sottoposti ad attività iversa quale il nuoto, si suppone che il nuoto rappresenti uno sforzo fisico maggiore, testimoniato anche dall'aumento dei livelli di lattato (Joles et al., 1984).

2.8 Proteinuria e diabete mellito

Come sopra riportato, la nefropatia rappresenta la più grave complicazione del DM nell'uomo. Si tratta di progressive alterazioni glomerulari riscontrate anche nel cane e nel gatto in cui, tuttavia, spesso la nefropatia è un riscontro post-mortem e definita in base lesioni istologiche (Muñana, 1995). Microscopicamente, la nefropatia diabetica, è caratterizzata da:

- Ispessimento della membrana basale dei glomeruli e dei tubuli
- Incremento della matrice ialina mesangiale
- Incremento nella presenza di depositi subepiteliali
- Fibrosi e sclerosi glomerulari, fino all'occlusione delle arteriole iuxtaglomerulari

Poco, ad oggi, si conosce riguardo agli aspetti clinici che accompagnano la glomerulopatia diabetica nel cane. Il rene rappresenta un organo particolarmente sensibile all'ipertensione che spesso accompagna la patologia diabetica (Struble et al., 1998) e che si riflette anche a carico del glomerulo renale; nella nefropatia diabetica il sistema di autoregolazione della pressione a livello dell'arteriola afferente al glomerulo viene meno, essa si dilata, la pressione nel distretto glomerulare aumenta e, nel tempo, si sviluppa necrosi e ialinosi dei capillari glomerulari e proteinuria (Struble et al., 1998; Poggi et al., 2000). Le alterazioni istologiche si concludono nella glomerulosclerosi che si evidenzia con ispessimento e obliterazione dei capillari glomerulari (Muñana, 1995) Nelle fasi precoci la GFR aumenta secondariamente ad un aumento del flusso e della pressione intracapillare glomerulare. Le cause che si ritengono responsabili dell'aumento della GFR includono:

- Aumento dell'espansione dei fluidi extracellulari causato dall'iperglicemia
- Ipertrofia renale
- Aumento di secrezione di ormone somatotropo (GH) e di glucagone
- Alterazione degli ormoni vasoattivi

Con il progredire della nefropatia la GFR diminuisce e ciò avviene all'avanzare delle lesioni strutturali glomerulari; la microalbuminuria compare in associazione al calo della GFR (Muñana, 1995) a causa della perdita delle cariche negative che normalmente si trovano sulla membrana glomerulare indotta da un'alterata biosintesi dei proteoglicani ed, eventualmente, da glicosilazione delle proteine strutturali (Airoldi e Campanini, 1993).

Iperensione e nefropatia diabetica sono spesso associate, in realtà, ancora oggi non è chiaro se l'ipertensione sia la causa della malattia renale o se una malattia renale preesistente, magari subclinica, sia alla base della comparsa dell'ipertensione nel paziente diabetico. Ad ogni modo, si instaura un circolo vizioso tra ipertensione e nefropatia in grado di peggiorare la prognosi della patologia iniziale (Airoldi e Campanini, 1993; Struble et al., 1998). Nell'uomo, circa il 40-50% dei soggetti con IDDM sviluppa la nefropatia con comparsa di insufficienza renale in due terzi degli stessi (Muñana, 1995).

Un adeguato controllo glicemico riduce la microalbuminuria del 39% e la macroalbuminuria del 54% nell'uomo diabetico (Airoldi e Campanini, 1993; Muñana, 1995). Infatti, la velocità con cui si sviluppa la sclerosi glomerulare è strettamente in dipendenza del controllo glicemico che, se adeguato, può determinare un calo significativo nell'incidenza delle vasculopatie, in particolare a carico del distretto renale eventualmente in associazione a terapie antiipertensive (Airoldi e Campanini, 1993; Muñana, 1995).

I possibili meccanismi coinvolti nell'ipertensione e, quindi, nell'alterazione glomerulare, nel cane, includono: un alterato metabolismo dei lipidi che comporta una ridotta "compliance" vascolare e uno stato di iperfiltrazione glomerulare o una microangiopatia della membrana basale glomerulare (Struble et al., 1998).

La nefropatia diabetica nell'uomo, si conclama con:

- Ridotta velocità di filtrazione glomerulare (VFG)
- Persistente proteinuria (> 0.05 g/die o 500 mg/die)
- Ipertensione arteriosa

La proteinuria che ne consegue causa danni progressivamente sempre meno reversibili a causa del danno indotto a carico delle cellule mesangiali glomerulari e delle cellule del tubulo prossimale; Il danno glomerulare è conseguente ad accumulo di lipoproteine e prodotti che derivano dalla loro ossidazione; conseguentemente aumenta la produzione di matrice il che causa attivazione monocitaria e produzione di ormone somatotropo (GH) che stimola la sclerosi. A livello tubulare il sovraccarico delle cellule stimola una risposta pro infiammatoria che sfocia in fibrosi (Wehner et al., 2008).

In uno studio su 50 cani affetti da DM (Struble et al., 1998) è stata valutata la prevalenza e la gravità di ipertensione e proteinuria che sono state correlate ad età, sesso, durata della patologia e controllo glicemico del soggetto.

In base ad U:P/C maggiore di 1, la proteinuria è stata rilevata nel 20% dei soggetti. Nell'uomo con DM, l'escrezione urinaria di albumine è aumentata principalmente da due fattori: in misura minore da uno scarso controllo glicemico e, in misura maggiore, dall'ipertensione (Struble et al., 1998).

Dallo studio sulla popolazione canina, è emersa una correlazione statisticamente significativa tra ipertensione e proteinuria, mentre il controllo glicemico, l'età, il sesso e la durata della patologia non sembrano in grado di influenzare un aumento di U:P/C. E', però opportuno sottolineare come il grado di controllo glicemico del soggetto sia stato giudicato in modo arbitrario; ciò potrebbe giustificare la mancata correlazione tra controllo della patologia e proteinuria. Infine, il 46% dei cani era iperteso; il dato è analogo alla prevalenza che si osserva nell'uomo con DM (40-80%) (Struble et al., 1998). La DAP e la MAP, ma non

la SAP, si presentavano più elevate nei soggetti da più tempo affetti dall'endocrinopatia.

2.9 Proteinuria e iperadrenocorticismo (o ipercortisolismo: HC)

L'iperadrenocorticismo o ipercortisolismo (HC) è una disendocrinia caratterizzata da numerosi segni clinici e complicazioni variabilmente associati e causati dagli effetti multi organici indotti dal cortisolo (Nichols, 1997). Le complicazioni ad esso associate includono: pielonefrite, insulino-resistenza, diabete mellito, ipertensione sistemica, pancreatite, insufficienza cardiaca congestizia, miopatie, glomerulopatie, iperlipidemia, tromboembolismo polmonare, segni neurologici nel caso in cui sia presente un macroadenoma, crisi addisoniana iatrogena (Nichols, 1977; Ortega et al., 1996).

Proteinuria ed ipertensione spesso sono associate e strettamente dipendenti l'una dall'altra. Si è già riportato come l'ipertensione affligga circa l'80% dei soggetti con HC non trattato o non adeguatamente controllato e ciò si osserva sia nel cane che nell'uomo; in quest'ultimo in una buona percentuale di soggetti l'ipertensione persiste anche dopo correzione dell'ipercortisolemia e circa nella metà dei soggetti si sviluppano alterazioni cardiovascolari. In uno studio (Ortega et al., 1996) su cani con HC, l'ipertensione era maggiormente presente nei soggetti non trattati e la percentuale di ipertesi è risultata essere analoga all'uomo.

Per quanto riguarda la proteinuria e considerando come patologico un valore di U:P/C > 1 (Ortega et al., 1996), i cani con PDH e quelli con ATH avevano U:P/C significativamente più alto rispetto a quelli con PDH ben controllato. In 12/26 (46%) soggetti con PDH non trattato U:P/C era > 1. U:P/C non era correlato in modo significativo a sesso ed età. Nei cani con HC ben controllato la percentuale di proteinurici era più bassa (24%).

In questo studio, la pressione arteriosa era più elevata e correlata in modo significativo alla proteinuria, suggerendo un'azione simile da parte del cortisolo a livello vascolare sistemico e glomerulare. I glicocorticoidi determinano un aumento del flusso a livello glomerulare causando una dilatazione nel distretto arteriolare renale e aumentando la velocità di filtrazione glomerulare; l'ipertensione glomerulare comporta un incremento nella filtrazione di albumine che, nel tempo, si accumulano e, in associazione a fenomeni ischemici, esitano in glomerulosclerosi. A questo punto, al glomerulo danneggiato si associa un progressivo peggioramento della proteinuria (sia in senso quantitativo che, nel tempo, qualitativo).

Le glomerulopatie in corso di HC includono glomerulonefrite e alterazioni glomerulari varie che possono esitare in glomerulo sclerosi (Nichols, 1977). Le glomerulonefriti, in genere, originano da infezioni croniche e da deposito o da difetto di *clearance* di immunocomplessi. La somministrazione di glicocorticoidi influenza la solubilità degli immunocomplessi; a causa dell'immunodepressione da essi indotta aumenta lo sviluppo in eccesso degli antigeni a fronte di un ritardo nella rimozione degli immunocomplessi da parte del sistema reticolo endoteliale (SRE) (Nichols, 1997). Al di là delle glomerulonefriti, spesso, nei cani con HC, si rileva la presenza di proteinuria. L'incidenza della proteinuria, sulla base di $U:P/C > 1$ in cani con HC in assenza di infezioni urinarie, oscilla tra il 47% (Ortega et al., 1996) e il 75% (Ortega et al., 1994).

In uno studio su 12 cani con HC (Ortega et al., 1994), 12/12 (100%) presentavano ipertensione diastolica ($DAP > 100$ mmHg) e 7/12 (58%) presentavano anche ipertensione sistolica ($SAP > 160$ mmHg). Tra gli stessi soggetti, il 75% presentava $U:P/C > 1$.

In uno studio su 16 cani con PDH (Hurley e Vaden, 1998), è stata valutata la proteinuria mediante analisi dell' $U:P/C$ e dell'escrezione proteica urinaria

nelle 24 ore (UPE: *Urine Protein Excretion*). U:P/C > 1 era considerato patologico; U:P/C < 0.5 fisiologico e compreso tra 0.5 e 1 dubbio. I cani con escrezione proteica urinaria fisiologica erano quelli con UPE < 20 mg/kg/dì.

Sette soggetti su sedici (44%) pre-terapia presentava U:P/C > 1, mentre in 3/16 (19%) U:P/C era 0.6-0.7. Pertanto, nel 62.5% dei soggetti U:P/C era > 0.6 e solamente nel 37.5% era < 0.5. Dopo la terapia con mitotane, in 10/16 (62.5%) U:P/C era normale e nei 3 soggetti che presentavano U:P/C dubbio, la proteinuria si era normalizzata con la terapia; tuttavia, non è emersa una differenza significativa tra U:P/C e UPE pre- e post-terapia (Hurley e Vaden, 1998). Da questo studio emerge ancora una volta un'azione da parte del cortisolo sulla funzionalità glomerulare renale che, non in tutti i casi, si risolve alla normalizzazione dei livelli sierici di cortisolo.

In uno studio di Medicina Umana (Koh et al., 2000) è stata valutata l'escrezione urinaria di albumina (UAE) pre-e post-terapia (rimozione chirurgica di neoplasia ipofisaria o surrenalica). Questo studio definisce il limite fisiologico superiore per UAE uguale a 9.6 µg/min, la MA come UAE compresa tra 20 e 200 µg/min e la proteinuria (o macroalbuminuria) come UAE > 200 µg/min. In 11/13 (84.6%) UAE era aumentata; tra questi, 7/11 erano microalbuminurici. In questo studio, in tutti i soggetti UAE si normalizzava dopo rimozione chirurgica della neoplasia. Alla normalizzazione di UAE, tuttavia, non corrispondeva un'analoga normalizzazione di Pa e glicemia post-prandiale (più elevate nei microalbuminurici e nei macroalbuminurici); ciò suggerisce che, nell'eziopatogenesi della proteinuria indotta dai glicocorticoidi, non sono solo l'ipertensione o l'insulino-resistenza ad avere un ruolo. In aggiunta a ciò, la biopsia renale eseguita in alcuni soggetti, non mostrava le caratteristiche tipiche di una nefropatia diabetica o da ipertensione (Koh et al., 2000) Si suppone che l'iperlipemia, di solito associata ad HC, possa giocare un ruolo; sarebbero gli acidi grassi liberi (FFA: free fatty acid) che si legano alle albumine plasmatiche inducendo un aumento nella loro

escrezione renale; inoltre, un aumento di FFA determinerebbe l'attivazione della Proteinchinasi C nelle cellule endoteliali vascolari renali che è implicata nello sviluppo del danno renale sia nei diabetici che non.

3 MATERIALE E METODI

3.1 Selezione dei soggetti

La casistica è stata raccolta presso il Dipartimento Clinico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria di Ozzano Emilia–Università di Bologna nel periodo 2004-2007. L'indagine è stata svolta su un due popolazioni patologiche che includono 20 cani affetti da diabete mellito (DM) e 14 soggetti con iperadrenocorticismo (o ipercortisolismo: HC). Ventuno cani sani rappresentavano il gruppo di controllo.

Per quanto riguarda il DM, sono stati inclusi i soggetti che presentavano, accanto ai segni clinici (poliuria, polidipsia, polifagia, dimagrimento), iperglicemia a digiuno e glicosuria ed aumento delle fruttosamine sieriche. Tra questi, 12 soggetti erano già sottoposti a terapia da un periodo non superiore ad un mese.

Nei cani con HC il sospetto diagnostico è stato fondato in base al riscontro anamnestico dei sintomi clinici, in base alla visita clinica ed alle indagini ematobiochimiche ed urinarie ed ha trovato conferma mediante il riscontro di almeno una positività ai *test* endocrini specifici (test di stimolazione con ACTH, test di soppressione con desametasone a basse dosi – LDDT ed eventuale test di soppressione con desametasone ad alte dosi – HDDT) e in base ai rilievi ottenuti mediante esecuzione di indagini collaterali di diagnostica per immagine, con particolare riferimento all'esame ecografico addominale.

Sono stati esclusi tutti i soggetti che presentavano infezione delle vie urinarie in base all'analisi del sedimento urinario ed eventuale esame batteriologico e soggetti che presentavano livelli sierici di creatinina od urea al di sopra dei limiti della norma.

In ogni soggetto appartenente allo studio e, quindi, anche negli animali appartenenti al gruppo di controllo, è stato eseguito un esame emocromocitometrico ed un profilo biochimico, nonché l'esame urinario comprensivo di esame chimico-fisico e del sedimento urinario e valutazione della proteinuria mediante misurazione del rapporto urinario proteine totali/creatinina (U:P/C) e del rapporto urinario microalbumina/creatinina (U:A/C).

La popolazione sana è stata utilizzata anche per definire l'intervallo di riferimento per U:P/C ed U:A/C.

3.1.1 Collezioe e stoccaggio dei campioni

In ciascun soggetto è stato eseguito il prelievo delle urine mediante cistocentesi ecoassistita. Il soggetto è stato posto in decubito laterale



Figura 11: Cistocentesi eco-guidata per prelievo sterile del campione urinario

destro o dorso-ventrale previa tricotomia e disinfezione mediante alcool

etilico dell'area deputata alla raccolta. Il prelievo è stato eseguito mediante siringhe da 5 ml con aghi da 22 G.

Ciascun campione è stato analizzato entro 30 minuti dal prelievo per l'esame chimico-fisico e del sedimento urinario.

Ciascun campione è stato centrifugato a 1500 giri per 5 minuti e suddiviso in 2 aliquote; una è stata conservata a 4°C in attesa della determinazione del rapporto urinario proteine totali/creatinina (U:P/C) effettuata entro 24 ore, mentre l'altra aliquota è stata stoccata a - 20°C per le successive analisi.

3.2 ANALISI

3.2.1 Esame chimico-fisico e del sedimento urinari

Queste analisi urinarie sono state eseguite presso il Laboratorio Clinico Veterinario seguendo un protocollo standard.

Dopo la valutazione visiva del campione per definirne colore e trasparenza, si valuta il peso specifico (P.S.) mediante rifrattometro. Dopo centrifugazione del campione viene impiegato il surnatante per il *test* colorimetrico su strisce reattive (Combur10Test[®] - Roche) per l'analisi semiquantitativa della proteinuria. Una goccia di urina viene fatta assorbire dalla carta da filtro fissata sulla striscia reattiva che contiene un indicatore in grado di legare i gruppi aminici delle proteine che si traduce in viraggio di colore. Dopo un minuto si esegue la lettura: l'intensità colorimetrica viene comparato ad uno standard di riferimento che include una scala di valori compresi tra 0 e 3+ e corrispondenti, rispettivamente, a concentrazioni proteiche urinarie pari a 0, 30, 100, 500 mg/dl.

Segue poi l'analisi del sedimento urinario sia sul sedimento tal quale che su sedimento colorato con colorante apposito (Sedi Stained, Dyaset s.r.l.). Al

microscopio si valuta l'eventuale presenza di cellule, cilindri, cristalli, batteri ecc.

3.2.2 Rapporto urinario proteine totali/creatinina

Le proteine totali e la creatinina sono state misurate individualmente sulle urine di tutti i soggetti dall'analizzatore automatico OLYMPUS AU 400 e poi è stato calcolato il rapporto.

La creatinina è stata determinata mediante metodo cinetico-colorimetrico secondo *Jaffè*. Il reagente contiene sodio idrossido ed acido picrico. La metodica consiste nella reazione, in ambiente alcalino indotto dall'idrossido di litio, della creatinina con l'acido picrico; si forma un complesso giallo-arancio. La concentrazione di questo complesso, letta come incremento di assorbanza, è relativa al contenuto di creatinina del campione.

Per la determinazione delle proteine urinarie si è utilizzato il metodo colorimetrico al Rosso di Pirogallolo. Il reagente comprende Rosso di Pirogallolo, Sodio Molibdato, Acido Succinico, Sodio Benzoato, Sodio Ossalato e Metanolo. Il metodo si basa sulla combinazione del Rosso di Pirogallolo con il Molibdato a formare un complesso di colore rosso che assorbe ad una lunghezza d'onda di 470 nm. Durante la reazione, in presenza di proteine, si forma un complesso di colore blu porpora che assorbe ad una lunghezza d'onda di 600 nm. L'assorbanza di questo complesso è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica del campione.

Il primo *test* è lineare, nelle urine, a concentrazioni comprese tra 1.0 e 600 mg/dl, mentre il secondo fino ad una concentrazione proteica pari a 200 mg/dl; tuttavia, impostando nell'analizzatore automatico un fattore di prediluizione o di concentrazione del campione, è possibile ampliare il *range* di linearità.

I reagenti utilizzati sono apposti per l'analizzatore Olympus AU e, ad involucro integro e conservati a 2-8 °C risultano stabili fino alla data di scadenza. Viceversa, una volta aperti e posti nell'analizzatore, si conservano fino a 30 giorni.

Il limite superiore fisiologico per U:P/C stabilito dal nostro laboratorio è pari a 0.6.

3.2.3 Microalbuminuria

Per la microalbuminuria (Microalbumina OLYMPUS) è stata utilizzata una analisi immunoturbidimetrica a punto finale effettuata dall'analizzatore automatico Olympus AU 400. Si tratta di una metodica utilizzata in Medicina Umana e validata nel cane (Gentilini et al., 2005).

I reagenti sono: anticorpi anti-albumina umana da capra; Tampone Tris (pH 7.6), Polietilenglicole 6000 (PEG) e conservanti. I reagenti ad involucro integro e conservati a 2-8°C sono stabili fino alla data di scadenza, mentre una volta aperti e posti nello strumento si conservano fino a 30 giorni.

Il principio della metodica si basa sulla reazione dell'albumina contenuta nel campione di urina con la soluzione PEG e l'antisiero, che causa l'interazione tra albumina umana ed anticorpi anti-albumina a formare aggregati insolubili. Questi aggregati, colpiti da un fascio luminoso, deviano la luce in base alla loro grandezza, forma e concentrazione. Il decremento dell'intensità della luce emessa (incremento di assorbanza) è il risultato dell'entità degli immunocomplessi formati. Pertanto, l'incremento di assorbanza, rilevato fotometricamente, è direttamente proporzionale alla concentrazione di albumina nel campione.

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo 0.5-30 mg/dl. I campioni che hanno concentrazione proteica maggiore a 30 mg/dl sono stati automaticamente diluiti dall'analizzatore, in modo da consentire

misurazioni comprese nell'intervallo del *test*. Se ancora fuori *range*, il risultato viene dato con un messaggio di errore.

Nel caso di elevate concentrazioni di creatinina l'albumina urinaria può essere sovrastimata; il contrario si può avverare a causa della presenza di abbondante glucosio nelle urine.

La metodica è stata validata nel cane (Gentilini et al., 2005) sfruttando la parziale cross-reattività tra anticorpi anti-albumina umana ed albumina canina è stato calibrato l'analizzatore automatico OLYMPUS AU 400 usando concentrazioni note di albumina canina.

L'analizzatore automatico è programmato con una linearità del test per concentrazioni comprese tra 0.5 e 30 mg/dl; campioni con concentrazioni superiori od inferiori al *range* di linearità vengono, rispettivamente, diluiti o concentrati 10 volte. Se di nuovo il campione ricade al di fuori del *range* di linearità lo strumento fornisce il risultato accanto ad un messaggio di errore.

Il limite superiore per U:A/C fissato dal nostro laboratorio è pari a 0.05.

3.2.4 Misurazione della Pressione arteriosa (Pa)

La Pa è stata misurata mediante metodiche indirette su tutti i soggetti appartenenti ai gruppi patologici.

Le misurazioni sono state rilevate in ambiente tranquillo, dopo un certo periodo di adattamento del soggetto all'ambiente circostante e variabile a seconda del temperamento dello stesso (almeno 5 minuti). Si è cercato di evitare ogni movimento fuorviante per la determinazione. Nella totalità dei casi il proprietario era presente al fine di confortare al meglio il proprio cane e quindi di ridurre il più possibile gli effetti ipertensivi indotti dallo *stress*.

Il soggetto è stato posto in decubito laterale od eventualmente sternale nel caso in cui mal tollerasse il posizionamento laterale.



Figura 12: Cane in posizionamento laterale per rilievo della Pa mediante strumento Doppler.

Sono state utilizzate la metodica oscillometrica (BP-88 Next, Colin Corporation, Japan) e la metodica ultrasonologica Doppler (Minidop ES-100 VX, Hadeco, Japan). La scelta della metodica è stata influenzata dalla taglia del cane: la metodica Doppler è stata impiegata nei soggetti di peso < 20 kg. L'ipertensione è stata definita in base alla Pa sistolica ≥ 160 mmHg.

E' stato applicato un manicotto di altezza pari al 40% della circonferenza dell'arto.

Sono state eseguite misurazioni seriali (almeno 9) e, dopo aver eliminato il valore massimo e minimo, è stata eseguita la media dei valori Pa sistolica,



Figura 13: Cane in posizionamento sternale per il rilievo della Pa mediante strumento oscillometrico

diastolica e media per l'oscillometria e Pa sistolica per la metodica Doppler.

4 RISULTATI

Tutti i dati ottenuti sono stati sottoposti ad un'indagine statistica descrittiva per dati non parametrici che ha previsto la loro comparazione mediante *test U di Mann-Whitney*. E' stato inoltre calcolato il coefficiente

Campione SANI	RAZZA	SESSO	PESO (Kg)	ETA' (anni)
1	Boxer	F	22	2
2	Pastore Tedesco	F	44	8
3	Meticcio	M	29	4
4	Setter Irlandese	M	18	3
5	Meticcio	MC	35	11
6	Golder Retriever	M	31	1
7	Meticcio	M	9	10
8	Spitz nano Tedesco	M	8	10
9	Meticcio	M	57	3
10	Meticcio	M	7	13
11	Meticcio	F	32	2
12	Meticcio	F	29	2
13	Pastore Tedesco	F	32	5
14	Pastore Tedesco	F	35	2
15	Meticcio	F	37	10
16	Labrador Retriever	F	21	2
17	Meticcio	FS	30	8
18	Meticcio	M	15	1
19	Meticcio	M	21.50	5
20	Meticcio	F	24	6
21	Pastore Tedesco	M	30	1

Tabella 4: Segnalamento cani SANI (controllo) (F: femmina; FS: sterilizzata; M: maschio; MC: castrato)

di correlazione "r" di Spearman.

Sono stati definiti statisticamente significativi i valori con $p < 0.05$ (e altamente significativi quelli con $p < 0.01$).

Sono stati confrontati i dati tra la popolazione patologica (comprendente sia i soggetti con DM che quelli con HC) e popolazione sana e, inoltre, sono

CAMPIONE DM	RAZZA	SESSO	PESO (KG)	ETA' (anni)
1	Meticcio	M	6	15
2	Pinscher medio	M	7	13
3	Setter Inglese	M	24	6
4	Barbone Toy	F	3	13
5	Setter Inglese	F	20	7
6	Meticcio	M	30	13
7	Siberian Husky	F	18	9
8	Meticcio	FS	6	9
9	Meticcio	FS	13	15
10	Barbone Toy	FS	6	12
11	Setter Inglese	M	20	9
12	Meticcio	FS	28	11
13	Meticcio	FS	9	8
14	Setter Inglese	F	16	11
15	Setter Inglese	F	23	9
16	Meticcio	FS	16	12
17	Meticcio	F	11	10
18	Setter Inglese	F	18	11
19	Yorkshire Terrier	F	4	12
20	Samoiedo	M	24	9

Tabella 5: Segnalamento cani con DM (n.20) (F: femmina; FS: sterilizzata; M: maschio; MC: castrato)

stati confrontati i dati dei singoli gruppi patologici tra loro e con la popolazione di controllo.

Nel gruppo di controllo (n. 21) erano compresi 10 femmine e 11 maschi; l'età era compresa tra 1 anno e 11 anni (media \pm sd: 5,2 \pm 3,9; mediana 4).

Il gruppo dei cani affetti da DM (n. 20) ha incluso 6 maschi e 14 femmine di età compresa tra 6 e 15 anni (media \pm sd: 10,7 \pm 2,5; mediana 11).

Nel gruppo dei cani con HC (n.14) erano presenti 7 femmine e 7 maschi di età compresa tra 6 e 17 anni (media \pm sd: 10,3 \pm 3; mediana 9,5).

Tutti i soggetti con HC erano affetti da PDH (microadenoma ipofisario). In un unico soggetto era stata rilevata la presenza di un macroadenoma ipofisario mediante Tomografia Assiale Computerizzata (TAC).

CAMPIONE HC	RAZZA	SESSO	PESO (Kg)	ETA' (anni)
1	Coton de Toulear	M	8	8
2	Segugio Italiano	F	23	10
3	Meticcio	M	10	6
4	Meticcio	FS	9.50	9
5	Segugio Italiano	FS	16	10
6	Pastore Tedesco	M	30	9
7	Yorkshire Terrier	F	4	6
8	Meticcio	FS	12	9
9	Meticcio	MC	5	14
10	Bracco Ungherese	MC	21	13
11	Siberian Husky	FS	38	11
12	Meticcio	M	34	9
13	Bassotto nano	FS	7.50	17
14	Meticcio	M	38	13

Tabella 6: Segnalamento dei cani con HC (n. 14) (F: femmina; FS: sterilizzata; M: maschio; MC: castrato)

In tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati eseguiti l'esame chimico-fisico e del sedimento urinario e le determinazioni di U:P/C ed U:A/C.

Il P.S. delle urine nella popolazione sana variava da 1012 a 1060 (media \pm sd: 1035 \pm 11; mediana: 1036); considerando normale un valore di P.S. \geq 1030, 5/21 (23.8%) presentavano P.S. $<$ 1030. Tra questi soggetti con urine ipostenuriche, il P.S. era compreso tra 1012 e 1024; il soggetto con minor P.S. presentava anche un valore di U:P/C *borderline* (0,6) e un U:A/C pari a

0,07 (lievemente aumentato); negli altri cani sani con P.S. < 1030, ma più elevato di 1012, U:P/C ed U:A/C erano nella norma. Nel gruppo dei diabetici il P.S. variava da 1005 a 1064 (media \pm sd: 1035 \pm 13; mediana: 1033). I soggetti con P.S. < 1030 erano 6/20 (30%). Tra questi, il P.S. era compreso tra 1005 e 1028. Nel soggetto con P.S. pari a 1005 U:P/C e U:A/C erano entrambi nella norma (rispettivamente 0,3 e 0,03), era normoteso e presentava come unica alterazione un aumento importante della SAP (1325 U/L); un soggetto con P.S. pari a 1028 presentava aumento sia di U:P/C che di U:A/C (rispettivamente 0,7 e 0,26), in un soggetto con P.S. pari a 1024 U:P/C ed U:A/C erano fortemente alterati (6,6 e 6,7 rispettivamente), mentre nei rimanenti U:P/C era < 0,6 e U:A/C < 0,05.

Nei cani con HC il P.S. variava da 1002 a 1028 (media \pm sd: 1011 \pm 8; mediana: 1009). Era inferiore a 1030 in 14/14 (100%). Tra questi, il valore

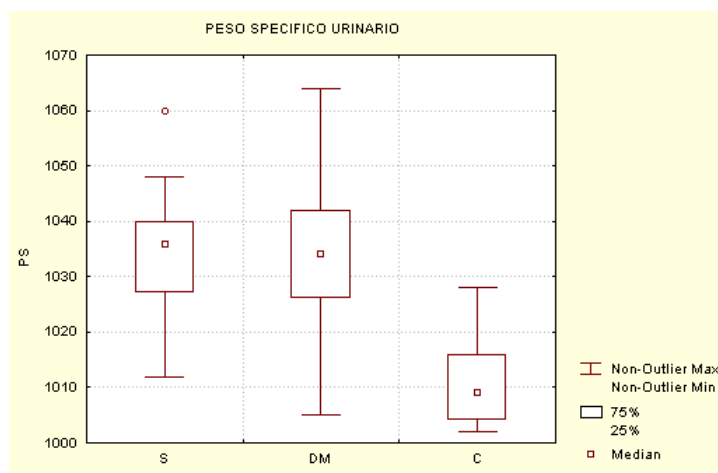


Figura 14: Mediana, 50 percentile centrale e range dei valori di Peso Specifico (PS) urinario nei tre gruppi (S: sani; DM: Diabete Mellito; C: Cushing)

più elevato di U:P/C era pari a 7,1 e il valore più elevato di U:A/C era pari a 5.5, ciò nello stesso soggetto, che, tra tutti, era quello con P.S. più elevato (1028).

Segue elenco dei vari P.S. dei cani con HC e i valori di U:P/C ed U:AC,

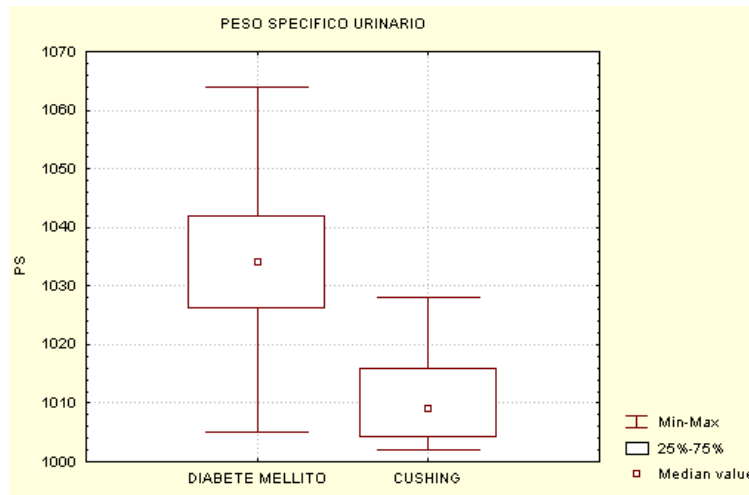


Figura 15: Mediana, 50 percentile centrale e range dei valori di Peso Specifico urinario (P.S.) dei cani con DM e HC

rispettivamente:

1028 (7,1-5,5); 1010 (4,3-3,26); 1002 (2,1-1,4); 1006 (1,6-0,74); 1008 (0,2-0,006); 1002 (0,4-0,03); 1014 (0,2-0,1); 1018 (4,7-3,6); 1020 (0,3-0,007); 1020 (0,7-0,4); 1002 (0,4-0,08); 1006 (0,2-0,02); 1006 (2,3-1,35); 1014 (2,2-1,3).

Per quanto riguarda l'escrezione media urinaria di albumine, il valore

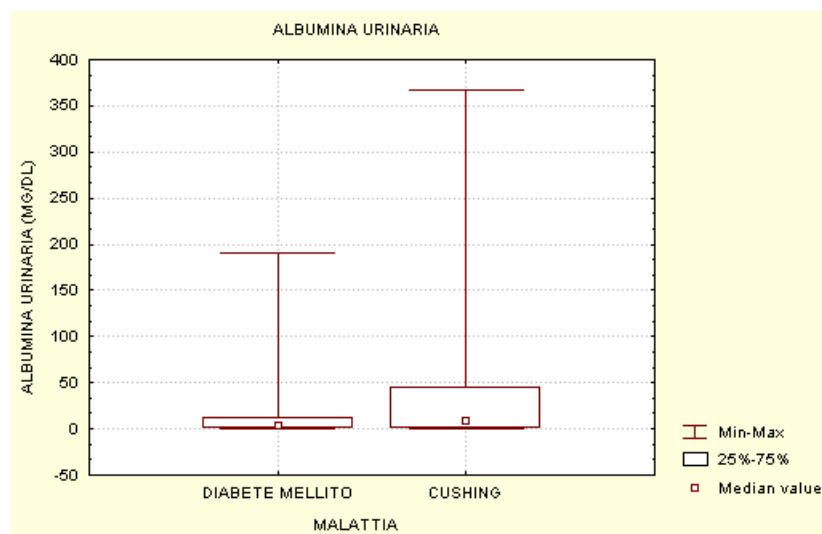


Figura 16: Mediana, 50 percentile centrale e range dei valori di concentrazione urinaria di albumine (microalbuminuria) nei due gruppi patologici (DM e HC).

medio nelle tre popolazioni era $1,79 \pm 2,18$; $20,02 \pm 43,25$; $52,02 \pm 98,27$ rispettivamente nei cani sani, diabetici ed ipercortisolemici. La differenza nell'escrezione urinaria di albumina emersa tra i sani e i diabetici è altamente significativa ($p = 0,008$), così pure confrontando i sani e i soggetti con HC ($p = 0,011$).

U:A/C, che rappresenta un valore più accurato della microalbuminuria tal

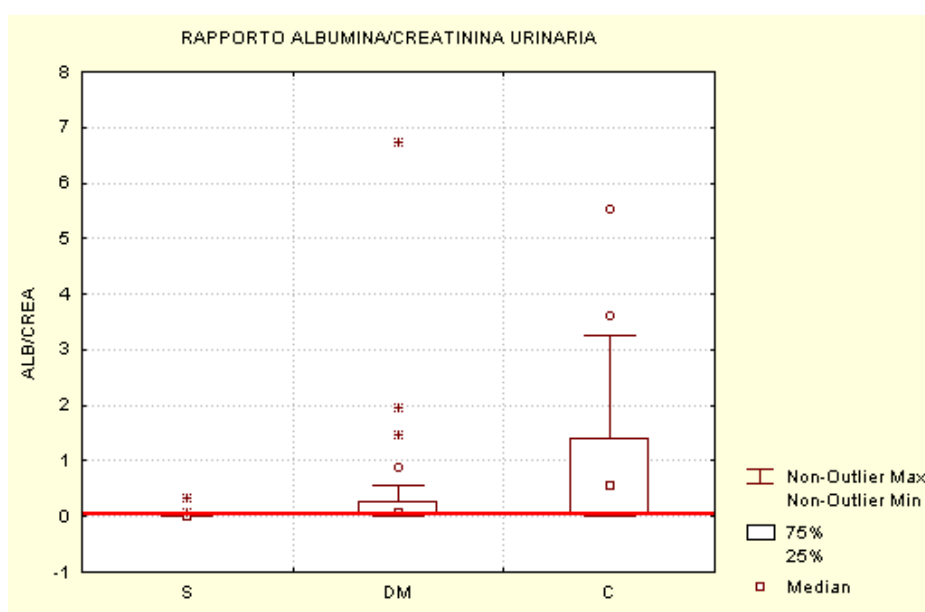


Figura 17: Mediana, 50 percentile centrale e range dei valori di U:A/C nelle 3 popolazioni

SANI	0,02 ± 0,07
DM	0,62 ± 1,52
HC	1,27 ± 1,70

Tabella 7: U:A/C media \pm sd nelle 3 popolazioni esaminate

quale nel cane, era compreso tra 0,00 e 0,34 (media \pm sd: $0,02 \pm 0,07$; mediana: 0,00) nel gruppo di controllo; tra 0,00 e 6,72 (media \pm sd: $0,62 \pm$

1,52; mediana: 0,08) nei diabetici; tra 0,00 e 5,52 (media \pm sd: $1,27 \pm 1,70$; mediana: 0,56) nei soggetti con HC.

Per quanto riguarda U:P/C, nel gruppo di controllo era compreso tra 0,1 e 0,6 (media \pm sd: $0,17 \pm 0,15$; mediana: 0,1); nei diabetici U:P/C era compreso tra 0,1 e 6,6 (media \pm sd: $0,93 \pm 1,54$; mediana: 0,3); nei cani con

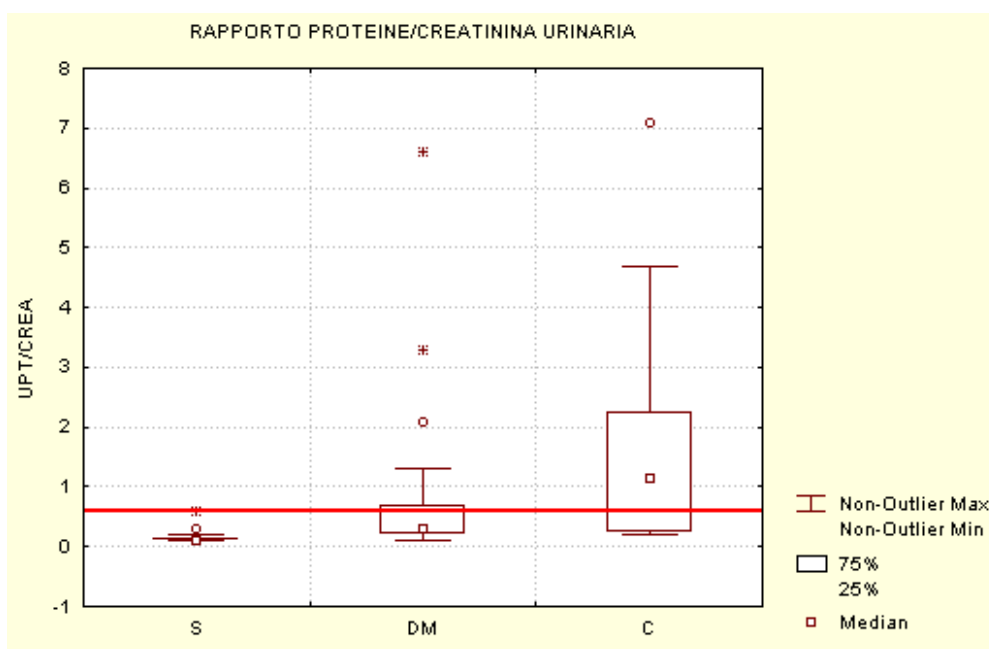


Figura 18: Mediana, 5° percentile centrale e range dei valori di U:P/C nelle 3 popolazioni

SANI	0,17 \pm 0,15
DM	0,93 \pm 1,54
HC	1,90 \pm 2,11

Tabella 8: Concentrazione media \pm sd di U:P/C nelle 3 popolazioni

HC era compreso tra 0,2 e 7,1 (media \pm sd: $1,90 \pm 2,11$; mediana: 1,15).

Nei cani con DM, U:A/C era al di sopra del *range* di riferimento ($> 0,05$) in 11/20 (55%) soggetti. Tra questi, 5 (25% sulla popolazione totale) presentavano solo l'U:A/C patologico, a fronte di un valore di U:P/C nella norma ($\leq 0,6$). I restanti 6 soggetti (30 % sulla popolazione totale)

presentavano un aumento sia di U:A/C che di U:P/C. Quattro tra questi ultimi erano già sottoposti a terapia insulinica.

Nei soggetti con HC, U:P/C ed U:A/C erano entrambi aumentati al di sopra dei limiti della norma in 10/14 (72%) mentre in 2/14 (14%) solo l'U:A/C era

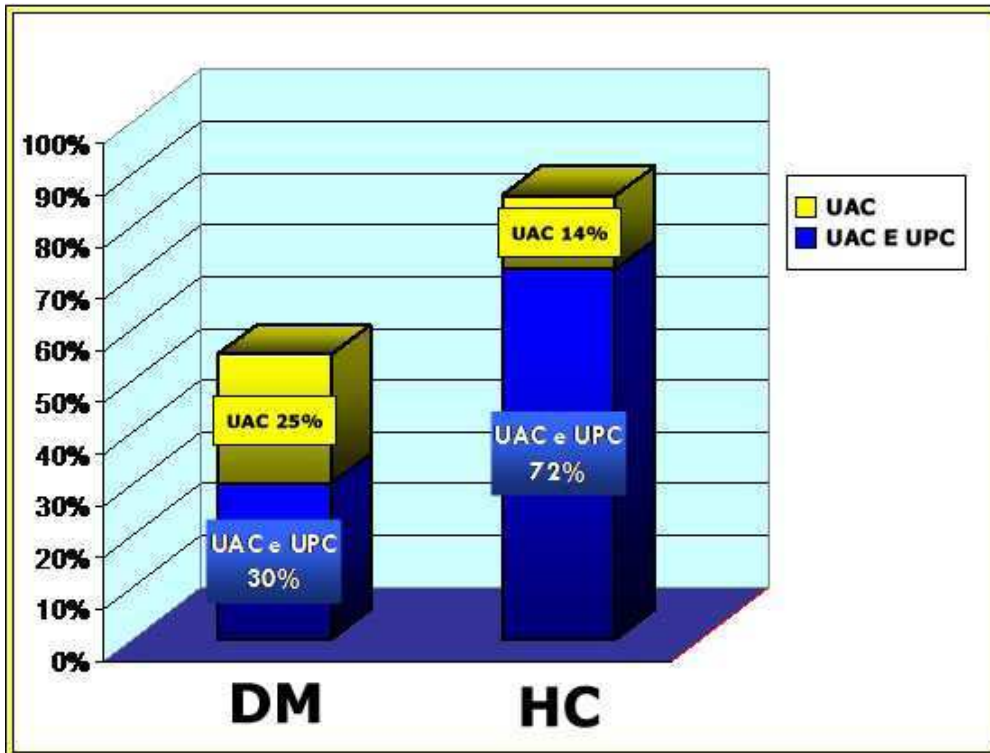


Figura 19: Proporzione di soggetti nei 2 gruppi patologici (DM, HC) in cui sono alterati rispettivamente solo U:A/C o sia U:A/C e U:P/C. DM: diabete mellito; HC: ipercortisolismo UAC: rapporto urinario albumina/creatinina; UPC: rapporto urinario proteine

al di sopra dei limiti fisiologici.

Per quanto riguarda la pressione arteriosa, è stata considerata solo la pressione arteriosa sistolica (SAP: Systolic Arterial Pressure) che, nei diabetici, era compresa tra 88 e 203 mmHg (media \pm sd: 143 ± 33 mmHg) con valore ≥ 160 mmHg in 7/20 (35%). Nei soggetti con HC era compresa tra 116 e 200 mmHg (media \pm sd: 167 ± 26 mmHg) con 9/14 (64%) ipertesi.

Dai risultati è emersa una mancanza di correlazione statisticamente significativa tra pressione arteriosa e proteinuria. Nei diabetici U:P/C ed U:A/C erano entrambi aumentati in 3 ipertesi e in 3 normotesi, mentre il solo aumento di U:A/C era presente in 2 ipertesi e 3 normotesi. Nei cani con HC l'aumento contemporaneo di U:P/C ed U:A/C è stato rilevato in 6

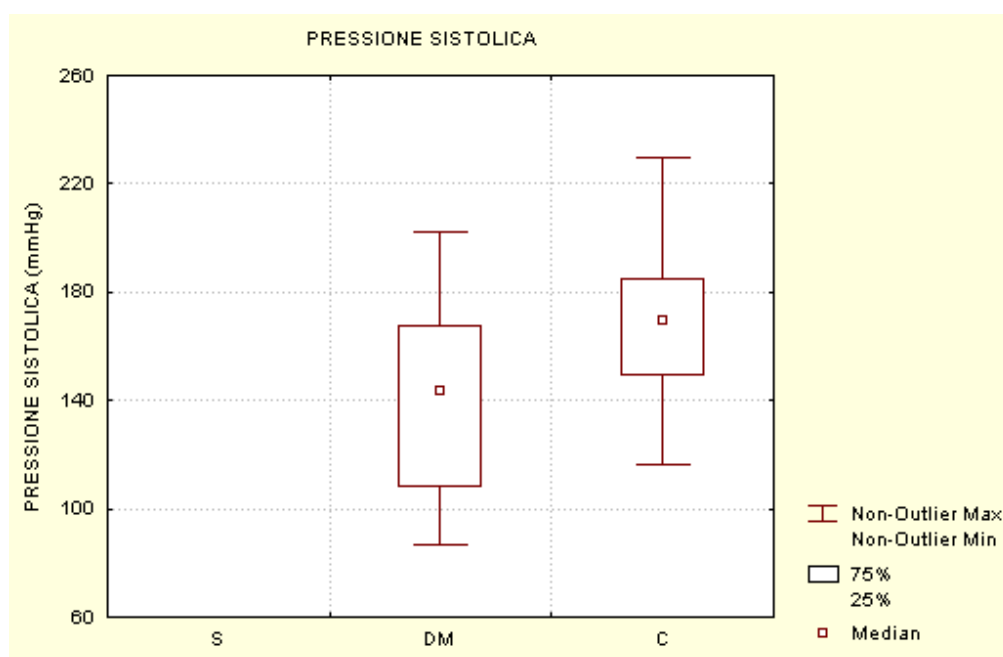


Figura 20: Mediana, 50 percentile centrale e range dei valori di pressione arteriosa (Pa) nei cani con DM e HC

ipertesi e in 2 normotesi, mentre il solo aumento di U:A/C in uno iperteso e in uno non iperteso.

Da questa indagine emerge una differenza statisticamente significativa tra escrezione proteica degli animali sani e quelli patologici. La proteinuria non è risultata significativamente correlata alla pressione arteriosa sistolica sebbene si sia evidenziata una correlazione positiva U-Alb (microalbuminuria urinaria) e pressione con significatività $p=0,06$ ($R=0,32$).

All'esame biochimico, il colesterolo totale sierico nei cani con DM era compreso tra 212 e 902 (media \pm sd: 404 \pm 170; mediana: 332) tra 238 e 625 (media \pm sd: 383 \pm 123; mediana 348) nei cani con HC.

Considerando che il *range* fisiologico di riferimento nel nostro laboratorio

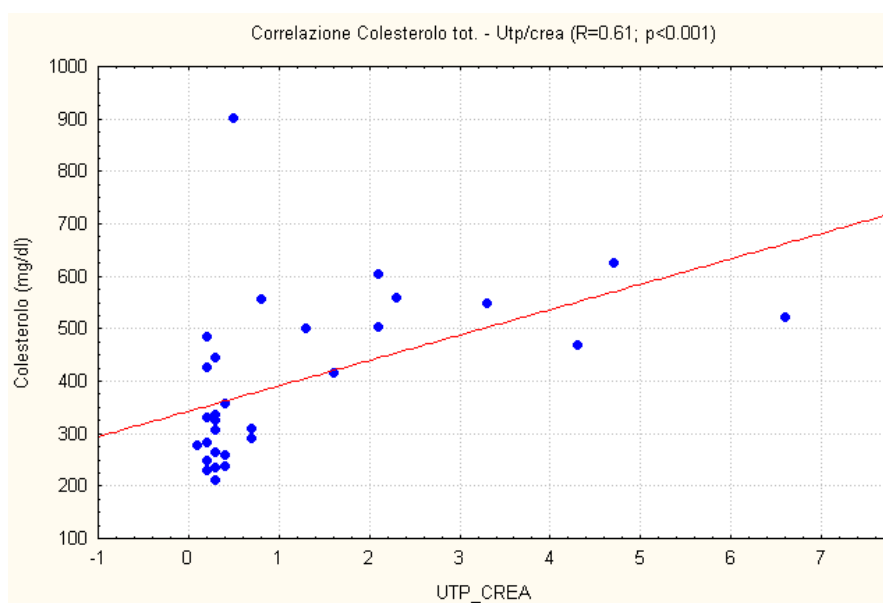


Figura 21: correlazione tra colesterolo totale e U:P/C nei soggetti patologici (n. 34)

Colesterolo sierico (mg/dl)	
DM	404 \pm 170
HC	383 \pm 123

Tabella 9: colesterolo sierico medio \pm sd nelle due popolazioni patologiche

per il colesterolo sierico è compreso tra 140 e 350 mg/dl, 9/20 (45%) dei diabetici presentava una concentrazione maggiore al *range* superiore di riferimento. Nei cani con HC il colesterolo è stato misurato in 13/14 soggetti; era aumentato in 6/13 (46%). Comparando U:P/C e colesterolo su 33 soggetti patologici (n. 20 DM e n. 13 HC) è emersa una correlazione

altamente significativa ($p = 0,0001$). Anche dalla comparazione tra U:A/C e colesterolo ed albumina urinaria (U-Alb) e colesterolo è emersa una correlazione significativa ($p < 0,05$).

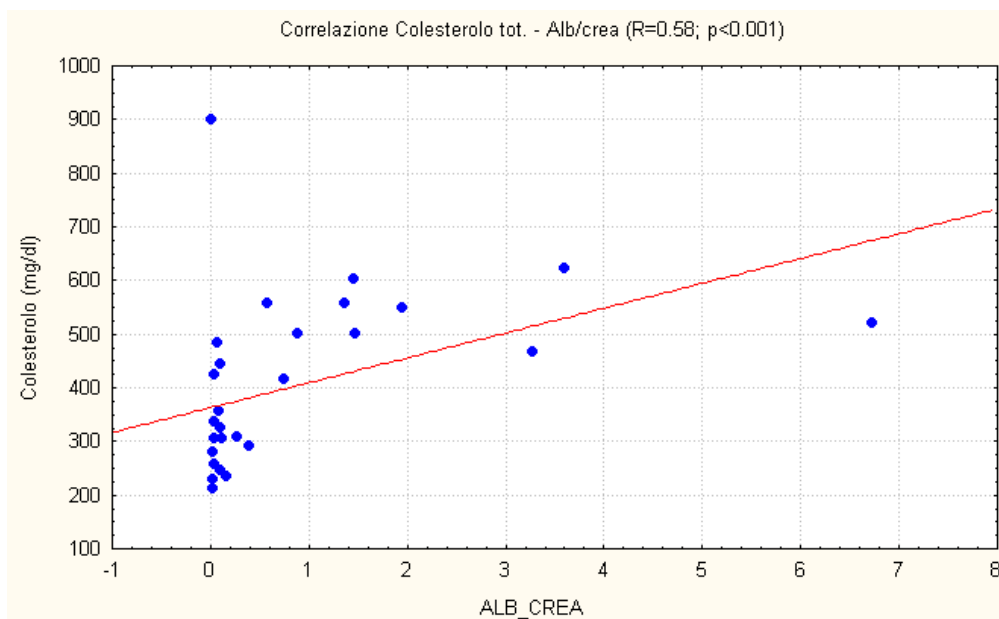


Figura 22: Correlazione tra colesterolo sierico e U:A/C nei soggetti patologici (n.34)

Per quanto riguarda l'età e considerando solo i due gruppi patologici, contrariamente a quanto affermato da precedenti studi, non è risultata correlata in modo significativo né alla proteinuria (U:Pt; U:P/C; U:A/C), né alla pressione arteriosa ($p > 0,05$).

Mediante correlazione tra peso specifico urinario (P.S.) e parametri sierici ed urinari, è emersa una correlazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) con i seguenti parametri sierici (valutati in 33 soggetti patologici): creatinina sierica, urea, glicemia (n.33 soggetti) in modo direttamente proporzionale, mentre in modo inversamente proporzionale con ALT e SAP. Al contrario, il P.S. non è significativamente correlato né all'U:P/C né all'U:A/C, mentre lo è, ovviamente, con l'escrezione urinaria della

creatinina. L'ipertensione non è correlata in modo significativo al P.S. urinario.

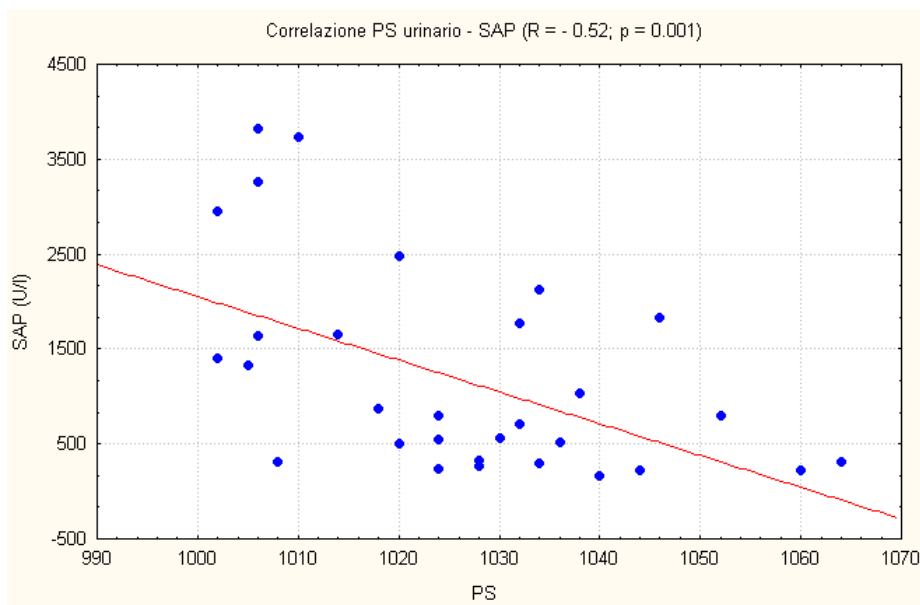


Figura 23: Correlazione tra peso specifico urinario (PS) e fosfatasi alcalina (SAP) nei soggetti patologici (n.33)

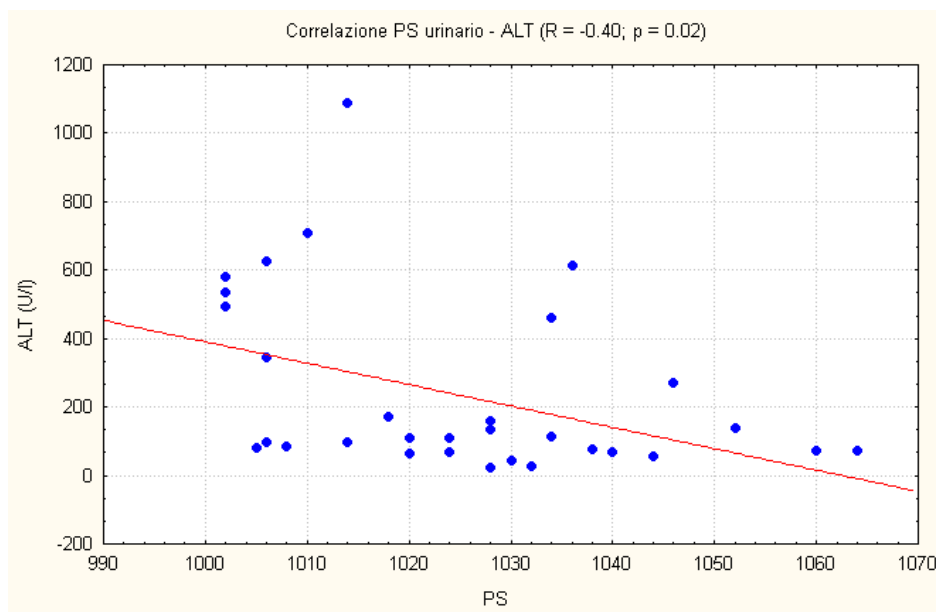


Figura 24: Correlazione tra peso specifico urinario (PS) e ALT nei soggetti patologici (n.33)

La fosfatasi alcalina (SAP: serum alkaline phosphatase) era al di sopra del limite superiore di riferimento (> 180 U/L) in 19/20 (95%) dei diabetici e nel 100% dei soggetti con HC. I valori medi \pm sd nelle due popolazioni patologiche erano 735 ± 594 e 2830 ± 3769 rispettivamente nei cani con DM e HC. Dalla comparazione di questo parametro sierico, è emersa una correlazione statisticamente significativa con U:P/C, U:A/C, U-Alb ed ALT ed inversamente proporzionale con il P.S. urinario.

L'ALT sierica era compresa tra 27 e 614 U/L (media \pm sd: 136 ± 149) nei cani con DM e tra 23 e 1087 U/L (media \pm sd: 359 ± 320) nei cani con HC. Era aumentata oltre il limite superiore di riferimento (> 55 U/L) in 16/20 (80%) soggetti con DM e in 13/14 (93%) cani con HC. È emersa una correlazione direttamente proporzionale con SAP e inversamente proporzionale al P.S. urinario.

Sia la glicemia (valutata in tutti i soggetti patologici: n.34) che le fruttosamine (misurate su 13 soggetti affetti da DM), in questa indagine, non sono risultate significativamente correlate alla proteinuria e alla pressione arteriosa.

Il livello di trigliceridi sierici è stato misurato solo in 11 soggetti patologici e dalla loro comparazione è emersa una correlazione significativa con U-Pt e U:A/C, ma non con U:P/C.

La creatinina sierica è risultata essere significativamente correlata, oltre che al P.S. urinario, alla bilirubina totale sierica mentre non è correlata in modo significativo né alla proteinuria (U:P/C, U:A/C, U-Pt e U-Alb), né alla pressione e all'età del soggetto.

5 CONCLUSIONI

L'obiettivo principale di questo studio era quello di valutare la presenza e l'entità della proteinuria in cani affetti da Diabete Mellito (DM) e Ipercortisolismo (HC). I risultati ottenuti permettono di confermare l'esistenza di una maggior escrezione proteica urinaria nei cani affetti dalle disendocrinie prese in esame rispetto ai cani sani. Infatti è emersa una differenza altamente significativa comparando la proteinuria tra sani e diabetici ($p=0,008$) e tra sani e ipercortisolemici ($p=0,011$). Nell'ambito dei gruppi patologici, la percentuale di proteinurici è risultata essere pari al 55% nei cani con DM e pari all'86% nei cani con HC. Tra i diabetici proteinurici, il 30% presentava un'altrazione sia del rapporto urinario proteine totali/creatinina (U:P/C) che del rapporto urinario albumina/creatinina (U:A/C), mentre nel 25% l'U:A/C era aumentato a fronte di un U:P/C nel *range* di riferimento. Nella popolazione dei cani con HC, la percentuale di proteinurici era più elevata (86%) e, tra questi, nel 72% sia U:P/C che U:A/C erano al di sopra del riferimento fisiologico e nel 14% solo U:A/C era patologico. Questo dato permette di confermare l'esistenza di soggetti all'interno delle disendocrinie oggetto dello studio di soggetti nei quali esiste una proteinuria patologica, compresa nell'intervallo definito, in Medicina Umana, come microalbuminuria non svelabile dalle metodiche semiquantitative e quantitative fino ad oggi più comunemente impiegate. L'introduzione del tutto nuova del parametro microalbuminuria in Medicina Veterinaria e i pochi studi disponibili ad oggi, non consentono di conoscerne il significato clinico. Tuttavia, prendendo ad esempio la Medicina Umana in cui riveste un importante ruolo come marker precoce di danno renale e considerando la sempre maggiore attenzione rivolta alla proteinuria come indice prognostico anche nei nostri

animali, si può supporre che, anche nel cane, possa rappresentare l'esordio di un danno renale ancora contenuto e più possibile di intervento terapeutico atto ad impedirne la progressione, analogamente a quanto avviene nell'uomo.

Da questo studio, contrariamente a quanto affermato dalla maggior parte delle precedenti indagini, la proteinuria non è risultata essere significativamente correlata all'ipertensione sistemica. E', però, importante sottolineare come nei lavori prodotti in Medicina Veterinaria, i limiti superiori fisiologici imposti sia per la pressione arteriosa (Pa) che per la proteinuria siano, fino ad oggi, piuttosto diversi tra gli Autori non essendo stati fissati dei limiti ben definiti ed essendo gli argomenti ancora non del tutto noti e soggetti a continua evoluzione. Inoltre, la microalbuminuria è un parametro assolutamente nuovo nella nostra medicina e nei lavori prodotti fino ad oggi i soggetti si consideravano proteinurici solo in base all'U:P/C.

E' ormai chiaro che il DM e l'HC, sia nell'uomo che nel cane, siano entrambi responsabili di un'anomala escrezione proteica urinaria attraverso diversi meccanismi più o meno direttamente causati dall'iperglicemia e dall'ipercortisolemia, rispettivamente.

Dai risultati ottenuti da questo studio si può supporre l'intervento di altri fattori in grado di causare una proteinuria patologica attraverso un'alterata filtrazione glomerulare.

La pressione arteriosa è stata misurata in tutti i soggetti patologici mediante metodica indiretta. E' stato utilizzato lo strumento oscillometrico o doppler a seconda della taglia dell'animale, prediligendo l'ultrasonologia doppler nei cani di peso inferiore ai 20 kg. E' stata presa in considerazione solo la Pa sistolica data la limitazione dello strumento doppler nel fornire anche il valore della Pa diastolica. E' opportuno sottolineare che da uno studio epidemiologico sulla Pa in un'ampia

popolazione canina (Bodey e Michell, 1966), si afferma come la Pa sistolica sia il parametro pressorio più facilmente influenzabile dai fattori in grado di alterare la pressione arteriosa sistemica e quindi in grado di fornire un'accurata informazione riguardo alla pressione arteriosa del soggetto in esame.

La pressione, da questo studio, influenza solo in minima parte, la comparsa della proteinuria nei cani con DM e HC che, probabilmente è influenzata da altri parametri alterati in corso delle endocrinopatie esaminate.

Per quanto riguarda la fosfatasi alcalina (SAP o ALKP o ALP: alkaline phosphatase), da questa indagine è emersa un' ovvia correlazione inversamente proporzionale al peso specifico (PS) urinario e una correlazione positiva e statisticamente significativa con ALT e con la proteinuria (U:P/C, U:A/C, U-Alb). L'ALP rappresenta un complesso metallo-enzimatico e comprende diverse isoforme e diversi isoenzimi. Nei cani sani, l'attività maggiore di ALP è presente a livello dei villi intestinali e, in quantità decrescente, nel rene, nel tessuto osseo, nel fegato e nel polmone (Milne e Doxey, 1986). Nei soggetti sani l'attività sierica totale della ALP è dovuta, principalmente alla LALP (ALP epatica) e, in misura minore, alla componente ossea BALP, anche se il loro rapporto è variabile in relazione all'età del soggetto. La CIAALP è un'isoforma della ALP il cui aumento è correlato ad un aumento dei livelli endogeni di glicocorticoidi, come avviene nell'HC o a terapie cortisoniche. Tuttavia, può essere presente in minime quantità nel cane sano e diverse patologie croniche o trattamenti farmacologici vari possono determinarne un aumento. In uno studio (Jensen e Poulsen, 1992) la CIAALP è stata rilevata in 28/29 cani con HC, in 7/9 cani con DM e in 33/66 cani affetti da varie patologie. Nel nostro studio, la percentuale di soggetti che presentavano un'alterazione della SAP è analoga (95% DM e 100% HC). Non abbiamo eseguito indagini elettroforetiche per riconoscere l'isoforma della SAP, tuttavia, la correlazione significativa con la proteinuria può fare supporre un ruolo

della SAP nella escrezione patologica proteica. Nell'uomo l'epatopatia, a prescindere dall'eziopatogenesi, determina un aumento di parametri che rappresentano un indice delle resistenze vascolari a livello renale e il cui aumento è associato alla gravità e ad un maggior rischio di progressione di nefropatia. Le alterazioni renali in corso di epatopatia, nell'uomo, sono spesso asintomatiche, almeno fino ad uno stadio piuttosto avanzato del disturbo e sono rappresentate da vasocostrizione corticale renale e da aumento delle resistenze a livello arterioso renale svelabili mediante ultrasonologia doppler. Anche nel cane sono segnalate le medesime alterazioni e si suppone che la causa di ipertensione renale eventualmente associata ad ipertensione sistemica sistemica risieda nella mancata attivazione epatica di una sostanza secreta dal rene ad azione vasodilatatrice. In un recente studio (Novellas et al., 2007) è stata studiato il flusso renale in corso di epatopatia ed è stata fatta una correlazione con i parametri sierici. Secondo questo studio, l'epatopatia si associa ad un aumento delle resistenze vascolari renali. Da questo studio l'ipertensione renale non si associa ad ipertensione sistemica ed è correlata in modo significativo ad ALKP e non ad ALT; anche nell'uomo gli indici associati ad ipertensione renale sono correlati ad alcuni parametri ematobiochimici, ma non ad ALT o AST. L'ipertensione sistemica associata ad epatopatia è riportata (Bodey e Michell, 1996), mentre secondo altri no (Novellas et al., 2007). Nella nostra indagine non è stata valutata la vascolarizzazione renale mediante ultrasonologia doppler e non sono state eseguite indagini elettroforetiche per individuare l'isoforma della SAP, ma si potrebbe supporre, data l'elevata correlazione con la proteinuria, che essa possa causare un'alterazione renale vascolare in grado di aumentare l'escrezione proteica urinaria analogamente a quanto sopra riportato nell'uomo e nel cane da altri Autori.

Sia il DM che l'HC si associano ad iperlipemia. Infatti, sia uno stato di insulinopenia che uno stato di ipercortisolemia si caratterizzano con

un'aumento della lipolisi che si traduce in ipertrigliceridemia/ipерcolesterolemia. Nell'uomo, l'ipertrigliceridemia si manifesta con una condizione definita NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) caratterizzata da un abnorme deposito lipidico a carico degli epatociti con o senza concomitante infiammazione o fibrosi/cirrosi epatica ed associata ad insulinoresistenza. La prevalenza di questa infiltrazione lipidica, nell'uomo iperlipemico che presenta ipertrigliceridemia e/o ipercolesterolemia è circa del 50% ed aumenta al 70% nel caso di ipertrigliceridemia. L'essere umano può rimanere asintomatico per un tempo piuttosto lungo e presentare solo un moderato aumento degli enzimi epatici all'esame ematobiochimico nelle fasi iniziali della NAFLD. In uno studio su cani predisposti all'iperlipemia primaria (Xenoulis et al., 2008) dove sono stati valutati sia soggetti con ipertrigliceridemia più o meno grave che soggetti non iperlipemici, l'ipertrigliceridemia marcata si associava ad un aumento degli enzimi epatici, ma soprattutto della ALP. L'infiltrazione lipidica epatica può causare colestasi e, quindi causare un aumento di ALP e, in misura minore, di GGT, mentre l'aumento di enzimi che si localizzano negli epatociti può conseguire in seguito a danno cellulare per alterata permeabilità della membrana.

L'iperlipemia, inoltre, è piuttosto comune nel corso di CRF (chronic renal failure) e, tra le cause, si riconosce un ruolo predominante all'iperparatiroidismo secondario che causa un'alterato metabolismo lipidico e conseguente iperlipemia che pone il soggetto a rischio di complicanze cardiovascolari mortali (Akmal et al., 1990). Infatti, nell'uomo, per ridurre le complicanze cardiovascolari indotte dall'iperlipemia si utilizzano terapie a base di statine che causano, nel tempo, una riduzione della proteinuria e un rallentamento della progressione della patologia renale (Agarwal R. e Curley T.M., 2005).

Pertanto, concludendo, si potrebbe supporre dai risultati ottenuti da questo studio e dall'elevata e significativa correlazione tra ALP e

colesterolo con la proteinuria che il DM e il HC possano indurre un'epatopatia caratterizzata da infiltrazione lipidica responsabile di alterazioni vascolari renali in grado di modificare l'unità di filtrazione glomerulare, ma si può anche supporre che l'iperlipemia secondaria ad iperparatiroidismo secondario possa indurre un aumento della BALP (ALP ossea); tuttavia, nei nostri soggetti non erano presenti riscontri all'esame biochimico suggestivi di iperparatiroidismo secondario, pertanto appare più verosimile la prima ipotesi. Dai risultati ottenuti si può concludere che sarebbe necessario monitorare anche la vascolarizzazione renale nei soggetti con HC e con DM e che sarebbe opportuno uno studio longitudinale al fine di monitorare l'andamento della proteinuria in relazione all'adozione di adeguate misure terapeutiche.

6 BIBLIOGRAFIA

Abid O.A., Sun Q., Sugimoto K., Mercan D., Vincent J.-L. (2001) – “Predictive value of microalbuminuria in medical ICU patients”. *Chest.*; **120**: 1984-1988.

Acierno M.J., Labato M.A. (2005) – “Hypertension in renal disease: Diagnosis and Treatment”. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*; **20**: 23-30.

Agarwal R., Curley T.M. (2005) – “The role of Statins in chronic kidney disease”. *Am. J. Med. Sci.*; **330**: 69-81.

Agewall S., Wikstrand J., Ljungman S., Fagerberg B. (1997) – “Usefulness of microalbuminuria in predicting cardiovascular mortality in treated hypertensive men with and without diabetes mellitus”. *Am. J. Cardiol.*; **80**: 164-169.

Akmal M., Kasim S.E., Solimar A.R., Massry S.G. (1990) – “Excess parathyroid hormone adversely affects lipid metabolism in chronic renal failure”. *Kidney Int.*; **37**: 854-858.

Airoidi G., Campanini M. (1993) – “La microalbuminuria: basi teoriche ed aspetti applicativi”. *Recenti Prog. Med.*; **84**: 210-224.

Alejandro R., Feldman E.C., Shienvold F.L., Mintz D.H. (1988) – “Advances in canine diabetes mellitus research: Etiopathology and results of islet transplantation”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **193**: 1050-1055.

Bakker A.J. (1999) – “Detention of Microalbuminuria. Receiver operating characteristic curve analysis favors albumine-to-creatinine ratio over albumin concentration. *Diabetes Care*; **22**: 307-313.

Bartges J.W., Willis A.M., Polzin D.J. (1996) – “Hypertension and renal disease”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **26**: 1331-1345.

Bazzi C., Petrini C., Rizza V., Arrigo G., Beltrame A., D’Amico G. (1997a) – “Characterization of proteinuria in primary glomerulonephritides. SDS-PAGE patterns: clinical significance and prognostic value of low molecular weight (“tubular”) proteins”. *Am. J. Kidney Dis.*; **29**: 27-35.

Behrend E.N., Kemppainen R.J. (2001) – “Diagnosis of canine hyperadrenocorticism”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **31**: 985-1003.

Behrend E.N., Kemppainen R.J. (1997) – “Glucocorticoid therapy: pharmacology, indications, and complications”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **27**: 187-213.

Bertoy E.H., Feldman E.C., Nelson R.W., Dublin A.B., Reid M.H., Feldman M.S. (1996) – “One-year follow-up evaluation of magnetic resonance imaging of the brain in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **208**: 1268-1273.

Bertoy E.H., Feldman E.C., Nelson R.W., Duesberg C.A., Kass P.H., Reid M.H., Dublin A.B. (1995) – “Magnetic resonance imaging of the brain in dogs with recently diagnosed but untrained pituitary dependent hyperadrenocorticism”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **206**: 651-666.

Biewenga W.J., Gruys E., Hendriks H.J. (1982) – “Urinary protein loss in the dog: nephrological study of 29 dogs without signs of renal disease”. *Res. Vet. Sci.*; **33**: 366-374.

Bodey A.R. , Mitchell A.R. (1996) – “Epidemiological study of blood pressure in domestic dogs”. *J. Small Anim. Pract.*; **37**: 116-125.

Bodey A.R. e Rampling M.W. (1999) – “Comparision of haemorrhological parameters and blood pressure in various breeds of dog”. *J. Small Anim. Pract.*; **40**: 3-6.

Bodey A.R., Michell A.R., Bovee K.C., Buranakurl C., Garg T. (1996) – “Comparision of direct and indirect (oscillometric) measurement of arterial blood pressure in conscious dogs”. *Res.Vet. Sci.*; **61**: 17-21.

Bodey A.R., Young L.E., Bartram D.H., Diamond M.J., Michell A.R. (1994) – “A comparision of direct and indirect (oscillometric) measurements of arterial blood pressure in anaesthetised dogs, using tail and limb cuffs”. *Res. Vet. Sci.*; **57**: 265-269.

Bonfanti U. (2003) – “Approccio clinico alla proteinuria”. *Atti SCIVAC*. Milano; **46**: 33-37.

Bovee K.C., Littman M.P., Crabtree B.J., Aguirre G. (1989) – “Essential hypertension in a dog”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **195**: 81-86.

Braddock J.A., Church D.B., Robertson I.D., Watson A.D.J. (2003) – “Trilostane treatment in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism”. *Aust. Vet. J.*; **81**: 600-607.

Bright J.M. e Dentino M. (2002) – “Indirect Arterial Blood Pressure Measurement in Nonsedated Irish Wolfhounds: Reference Values for the Breed”. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*; **38**: 521-526.

Brown S, Atkins C., Bagley R., Carr A., Cowgill L., Davidson M., Egnor B., Elliott J., Henik R., Labato M., Littman M., Polzin D., Ross L., Snyder P., Stepien R. (2007) – “Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats”. ACVIM Consensus Statement – *J. Vet. Intern. Med.*; **21**: 542-558.

Brown S.A., Brown C.A., Hendi R. (2000) – “Does systemic hypertension damage the canine kidney?”. *J. Vet. Intern. Med.*; **14**: 351A.

Brown S.A., Henik R.A. (1998) – “Diagnosis and treatment of systemic hypertension”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **26**: 1481-1494.

Chapman P.S., Kelly D.F., Archer J., Brockman D.J., Neiger R. (2004) – “Adrenal necrosis in a dog receiving trilostane for the treatment of hyperadrenocorticism”. *J. Small Anim. Pract.*; **45**: 307–310.

Danese R.D., Aron D.C. (1994) – “Cushing’s syndrome and hypertension”. *Endocrinol. and Metabol. Clin. North Am.*; **23**: 299-324.

De Jong P.E., Gansevoort R.T., Bakker S.J.L. (2007) – “Macroalbuminuria and microalbuminuria: do both predict renal and cardiovascular events with similar strenght?”. *J. Nephrol.*; **20**: 375-380.

Deen W.M., Satvat B. (1981) – “Determinants of the glomerular filtration of proteins”. *Am. J. Physiol.*; **241**: F162-F170.

Delack J.B., Stogdale L. (1983) – “Glycosylated haemoglobin measurement in dogs and cats: implication for its utility in diabetic monitoring”. *Can. Vet. J.*; **24**: 308-311.

Den Hertog E., Braakman J.C.A., Teske E., Kooistra H.S., Runberk A. (1999) – “Results of non-selective adrenocorticolysis by o,p'-DDT in 129 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism”. *Vet. Rec.*; **144**: 12-17.

Di Bartola S.P. (2002) – “Approccio clinico e valutazione di laboratorio della malattia renale”. In *Ettinger S.J., Feldman E.C.: Trattato di clinica medica veterinaria: malattie del cane e del gatto*. Il ed., Delfino, Roma: 1600–1614.

Diehl K.J. (1995) – “Long-term complications of diabetes mellitus, part II: gastrointestinal and infectious. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **25**: 731-751.

Duesberg C.A., Feldman E.C., Nelson R.W., Bertoy E.H., Dublin A.B., Reid M.H. (1995) – “Magnetic resonance imaging for diagnosis of pituitary macrotumors in dogs”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **206**: 657-662.

Dukes J. (1992) – “Hypertension: A review of the mechanisms, manifestations and management”. *J. Small Anim. Pract.*; **33**: 119-129.

Eastwood J.M., Elwood C.M., Hurley K.J. (2003) – “Trilostane treatment of a dog with functional adrenocortical neoplasia”. *J. Small Anim. Pract.*; **44**: 126-131.

Edwards N.J. (1992) – “Monitoraggio della pressione sanguigna con metodi non invasivi e trattamento dell’ipertensione”. *Suppl. Veterinaria*; **6**: 6-9.

Eigenmann J. E., Eigenmann R.Y., Rijnberk A., Van De Gaar I., Zapf J., Froesch E.R. (1983) – “Progesterone controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly”. *Acta Endocrinol. (Copenh)*; **104**: 167-176.

Eisenbarth G.S. (1986) – “Type 1 Diabetes Mellitus. A chronic autoimmune disease”. *N. Engl. J. Med.*; **314**: 1360-1368.

Elliott D.A., Nelson R.W., Feldman E.C., Neal L.A. (1997) – “Glycosylated haemoglobin concentrations in the blood of healthy dogs and dogs with naturally developing diabetes mellitus, pancreatic β -cell neoplasia, hyperadrenocorticism, and anemia”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **211**: 723-727.

Elliot J., Grauer G.F. (2007) – “Proteinuria”. In *BSAVA manual of Canine and Feline nephrology and urology*. 2th edition: 69-78.

Elliott D.A., Nelson R.W., Feldman E.C., Neal L.A. (1997) – “Glycosilated hemoglobin concentrations in the blood of healthy dogs and dogs with naturally developing diabetes mellitus, pancreatic β -cell neoplasia, hyperadrenocorticism, and anemia”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **211**: 723–727.

Famigli Bergamini P., Boari A., Impalà A. (1992) – “La determinazione delle fruttosamine nel cane: valori di riferimento ed osservazioni in soggetti con diabete mellito”. *Veterinaria*; **3**: 67-70.

Feldman e Nelson (2004) – “Canine Hyperadrenocorticism (Cushing’s Syndrome)”. In Feldman E.C., Nelson R.W.: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3th edition, ed Saunders: 251-357.

Feldman e Nelson (2004) – “Canine Diabetes Mellitus”. In Feldman E.C., Nelson R.W.: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3th edition, ed Saunders: 485-538.

Feldman E.C., Nelson R.W., Feldman M.S. (1996) – “Use of low and high-dose dexamethasone test for distinguishing pituitary dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **209**: 772-775.

Finco D.R. (2004) – “Association of systemic hypertension with renal injury in dogs with induced renal failure”. *J. Vet. Intern. Med.*; **18**: 289-294.

Finco D.R. (1999) - “Proteinuria”. In Osborne C.A., Finco D.R.: *Nefrologia e Urologia del cane e del gatto*. UTET, Milano: 213-217.

Fracassi F., Mazzi A., Pietra M., Famigli Bergamini P. (2004) – “Terapia con trilostano in 23 cani affetti da iperadrenocorticismo”. *Veterinaria*; **21**: 9-16.

Fracassi F., Pietra M., Boari A., Aste G., Giunti M., Famigli Bergamini P. (2004) – “Breed distribution of canine diabetes mellitus in Italy”. *Vet. Res. Commun.*; **28**: 339-342.

Gains M.J., Grodecki K.M., Jacobs R.M., Dyson D., Foster R.A. (1995) – “Comparision of Direct and Indirect Blood Pressure Measurements in Anesthetized Dogs”; *Can. J. Vet. Res.*; **59**: 238-240.

Gary A.T., Cohn L.A., Kerl M.E., Jensen W.A. (2004) – “The effects of exercise on urinary albumin excretion in dogs”. *J. Vet. Intern. Med.*; **18**: 52-55.

Gentilini F., Dondi F., Mastroilli C., Giunti M., Calzolari C., Gandini G., Mancini D., Famigli Bergamini P (2005) – “Validation of a human immunoturbidimetric assay to measure canine albumin in urine and cerebrospinal fluid”. *J. Vet. Diagn. Invest.*; **17**: 179-183.

Gershwin L.J. (1975) – “Familiar canine diabetes mellitus”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **167**: 479-480.

Gilson S.D., Withrow S.J., Wheeler S.L., Twedt D.C. (1994) – “Pheochromocytoma in 50 dogs”. *J.Vet. Intern. Med.*; **8**: 228-232.

Goy-Thollot I., Legros I., Cadorè J.L. (1994) – “Conduite diagnostique et thérapeutique du diabète sucré chez le chien”. *Le point Vet.*; **26**: 25-38.

Goy-Thollot I., Péchereaut D., Kéroack S., Dezempte J.C., Bonnet J.M. (2002) – “Investigation of the role of aldosterone in hypertension associated with spontaneous pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs”. *J. Small Anim. Pract.*; **43**: 489-492.

Grauer G.F., Di Bartola S.P. (2002) – “Malattia glomerulare”. In *Ettinger S.J., Feldman E.C.: Trattato di clinica medica veterinaria: malattie del cane e del gatto*. II ed., Delfino, Roma: 1662-1676.

Grauer G.F., Thomas C.B., Eicker S.W. (1985) – “Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the urine protein-to-creatinine ratio from a random, voided sample”. *Am. J. Vet. Res.*; **46**: 2116-2119.

Greco D.S. (2001) – “Diagnosis of diabetes mellitus in cats and dogs”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **31**: 845-853.

Grooters A.M., Bellier D.S., Theisen S.K., Miyabayashi T. (1996) – “Ultrasonographic characteristics of the adrenal glands in dog with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: comparison with normal dogs”. *J. Vet. Intern. Med.*; **10**: 110-115.

Gwin R.M., Gelatt K.N., Terrel T.G., Hood C.I. (1978) – “Hypertensive retinopathy associated with hypothyroidism, hypercholesterolaemia and renal failure in a dog”. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*; **14**: 200-209

Haberman C.E., Kang C.W., Morgan J.D., Brown S.A. (2006) – “Evaluation of oscillometric and Doppler ultrasonic methods of indirect blood pressure estimation in conscious dogs”. *Can. J. Vet. Res.*; **70**: 211-217.

Haines D.M., Penhale W.J. (1985) – “Autoantibodies to pancreatic islet cells in canine diabetes mellitus”. *Vet. Immunol. Immunopathol.*; **8**: 149-156.

Henik R.A. (1997) - “Systemic hypertension and its management”; *Vet. Clin North Am. Small Anim. Pract.*; **27**: 1355-1372.

Hess R.S., Kass P.H., Ward C.R. (2000) – “Breed distribution of dogs with diabetes mellitus to dogs with diabetes mellitus admitted to a tertiary care facility”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **216**: 1414-1417.

Hillier A., Desch C.E. (2002) – “Large-bodies Demodex mite infestation in 4 dogs”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **220**: 623-627.

Hoening M. (1995) – “Pathophysiology of canine diabetes”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **25**: 553-559.

Hoening M. (1995) – “Pathophysiology of canine diabetes”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **25**: 553-559.

Hoening M., Dawe D.L. (1992) – “A qualitative assay for beta cell antibodies. Preliminary results in dogs with diabetes mellitus”. *Vet. Immunol. Immunopathol.*; **32** : 195-203.

Hoerauf A., Reusch C. (1999) – “Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. *J. Am. Anim Hosp. Assoc.*; **35**: 193-199.

Hurley K.J., Sturgess K., Cauvin A., Kuipers R. (1998) – “The use of Trilostane for the treatment of hyperadrenocorticism in dogs”. *J. Vet. Intern. Med.*; **12**: 210.

Hurley K.J., Vaden S.L. (1998) – “Evaluation of urine protein content in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **212**: 369-373.

Ihle S.L. (1997) – “Pituitary corticotroph macrotumors: diagnosis and treatment”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **27**: 287-297.

Jacob F., Polzin D.J., Osborne C.A., Neaton J.D., Lekcharoensuk C., Allen T.A., Kirk C.A., Swanson L.L. (2003) – “Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **222**: 322-329.

Jacob F., Polzin D.J., Osborne C.A., Neaton J.D., Kirk C.A., Allen T.A., Swanson L.L. (2005) – “Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **226**: 393-400.

Jacoby R.C., Owings J.T., Ortega T., Gosselin R., Feldman E.C. (2001) – “Biochemical basis for the hypercoagulable state seen in Cushing’s syndrome; discussion 1006-7”. *Arch. Surg.*; **139**: 1003-1006.

Jensen A.L., Poulsen J.S. (1992) – “Preliminary experience with the diagnostic value of the canine corticosteroid induced alkaline phosphatase isoenzyme in hypercorticism and diabetes mellitus”. *Zentralbl Veterinarmed A.*; **39**: 342-348.

Jensen W.A., Grauer G.F., Andrews J., Simpson D. (2001) – “Prevalence of microalbuminuria in dogs” (abstract). *J. Vet. Intern. Med.*; **15**: 300.

Joles J.A., Sanders M., Velthuisen J., Den Hertog J.M., Van Dijk C. (1984) – “Proteinuria in intact and splenectomized dogs after running and swimming”. *Int. J. Sports Med.*; **5**: 311-316.

Kallet A.J., Cowgill L.D. (1992) – “Hypertensive states in the dog (abstr), in Proceedings. 10th American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM Forum): 79.

Kallet A.J., Cowgill L.D., Kass P.H. (1997) – “Comparison of blood pressure measurements obtained in dogs by use of indirect oscillometry in a veterinary clinic versus at home”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **210**: 651-654.

Kaplan A.J., Peterson M.E., Kemppainen R.J. (1995) – “Effects of disease on the results of diagnostic tests for use in detecting hyperadrenocorticism in dogs”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **207**: 445-451.

Kawamoto M., Kaneko J.J., Heusner A.A., Feldman E.C. (1992) – “Relation of fructosamine to serum protein albumin, and glucose concentration in healthy and diabetic dogs”. *Am. J. Vet. Res.*; **53**: 851-855.

Kemppainen R.J., Peterson M.E. (1993) – “Circulating concentration of dexamethasone in healthy dogs, dogs with hyperadrenocorticism and dogs with nonadrenal illness during dexametasone suppression testing”. *Am. J. Vet. Res.*; **54**: 1765-1769.

Kimmel S.E., Ward C.R., Henthorn P.S., Hess R.S. (2002) – “Familiar insulin-dependent diabetes mellitus in Samoyed dogs”. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*; **38**: 235-238.

Kintzer P.P., Peterson M.E. (1991) – “Mitotane (o,p'-DDT) treatment of 200 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism”. *J. Vet. Intern. Med.*; **5**: 182-190.

Kintzer P.P., Peterson M.E. (1997) – “Diagnosis and management of canine cortisol-secreting adrenal tumors”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **27**: 299-307.

Kipperman B.S., Feldman E.C., Dybdal N.O., Nelson R.W. (1992) – “Pituitary tumor size, neurologic signs, and relation to endocrine test results in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 43 cases (1980-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **201**: 762-767.

Kirk G.R., Jensen H.E. (1975) – “Toxic effect of o,p'-DDT in the normal dog”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **11**: 765-768.

Kobayashi D.L., Peterson M.E., Graves T.K., Lesser M., Nichols C.E. (1990) – “Hypertension in cats with chronic renal failure or hyperthyroidism”. *J. Vet. Intern. Med.*; **4**: 58-62.

Koh J.M., Kim J.Y., Chung Y.E., Park J.Y., Shong Y.K., Hong S.K., Kim G.S., Lee K.U. (2000) – “Increased urinary albumin excretion in Cushing’s syndrome: remission after correction of hypercortisolaemia”. *Clin. Endocrinol.*; **52**: 349-353.

Kramer J.W., Nottingham J., Robinette G., Lenz S., Sylvester S., Dessouky M.I. (1980) – “Inherited, early onset, insulin-requiring diabetes mellitus of Keeshond dogs”. *Diabetes*; **29**: 558-565.

Krawiec D. R. (2002) – “Proteinuria”. In Ettinger S.J., Feldman E.C. – Trattato di clinica medica veterinaria: malattie del cane e del gatto. II ed., Delfino, Roma: 100-102.

Lantz G.C., Ihle S.L., Nelson R.W., Carlton W.W. Feldman E.C., Lothrop C.D.Jr., Bottoms G.D. (1988) – “Transsphenoidal hypophysectomy in the clinically normal dog”. *Am. J. Vet. Res.*; **49**: 1134-1142.

Latimer K.S., Mahaffey E.A. (1984) – “Neutrophil adherence and movement in poorly and well-controlled diabetic dogs”. *Am. J. Vet. Res.*; **45**: 1498-1500.

Lees G.E., Brown S.A., Elliot J., Grauer G.F., Vaden S.L. (2005) – “Assesment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal)”. *J. Vet. Intern. Med.*; **19**: 377-385.

Leahy J.L. (1990) – “Natural history of β -cells dysfunction in NIDDM”. *Diabetes Care*; **13**: 992-1010.

Ling G.V., Lowenstine L.J., Pulley L.T., Kaneko J.J. (1977) – “Diabetes Mellitus in dogs: A review of initial evaluation, immediate and long-term management and outcome”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **170**: 521-530.

Littman M.P. (2002) – “Ipertensione”. In Ettinger S.J., Feldman E.C.; Trattato di clinica medica veterinaria: malattie del cane e del gatto. II ed., Delfino, Roma: 179-182.

Littman M.P., Robertson J.L., Bovee K.C. (1988) – “Spontaneous systemic hypertension in dogs: five cases (1981-1983). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **193**: 486-494.

Lulich J.P., Osborne C.A. (1990) – “Interpretation of urine protein-creatinine ratios in dogs with glomerular and nonglomerular disorders”. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*; **12**: 59-72.

Lulich J.P., Osborne C.A., Polzin D.J. (1996) – “Diagnosis and long-term management of protein-losing glomerulonephropathy – A 5-year case-based approach”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **26**: 1401-1416.

Mampalam T.J., Tyrrel J.B., Wilson C.B. (1988) – “Transphenoidal microsurgery for Cushin’s disease: A report of 216 cases”. *Ann. Intern. Med.*; **109**: 487-493.

Marmor M., Willeberg P., Glickman L.T. (1982) – “Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in dogs”. *Am. J. Vet. Res.*; **43**: 465-470.

Marshall T., Williams K.M. (1999) – “Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria”. *Electrophoresis*; **20**: 1307-1324.

Mattheeuws D., Rotiers R., Kaneko J.J., Vermeulen A. (1984) – “Diabetes mellitus in dogs: Relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response”. *Am. J. Vet. Res.*; **45**: 98-103.

McCaw D.L., Knapp D.W., Hewett J.E. (1985) – “Effect of collection time and exercise restriction on the prediction of urine protein excretion, using urine protein/creatinine ratio in dogs”. *Am. J. Vet. Res.*; **46**: 1665-1669.

McGuire N.c., Schulman R., Ridgway M.D., Bollero G. (2002) – “Detention of occult urinary tract infections in dogs with Diabetes Mellitus”. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*; **38**: 541-544.

Meij B.P. (2001) – “Hypophysectomy as a treatment for canine and feline Cushing’s syndrome”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **31**: 1015-1034.

Meij B.P., Voorhout G., Van den Ingh T.S. Hazewinkel H.A., Teske E., Rijnberk A. (1998) – “Results of transsphenoidal hypophysectomy in 52 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism”. *Vet. Surg.*; **27**: 246-261.

Melby J.C. (1989) – “Clinical Review 1: Endocrine hypertension”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; **69**: 697-703.

Meurs K.M., Miller M.W., Slater M.R. (1996) – “Comparision of the indirect oscillometric and direct arterial methods for blood pressure measurement in anesthetized dogs”. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*; **32**: 471-475.

Meurs K.M., Miller M.W., Slater M.R. (2000) – “Arterial Blood Pressure Measurement in a Population of Healthy Geriatric Dogs”. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*; **36**: 497-500.

Meurs K.M., Miller M.W., Slater M.R., Glaze K. (2000) – “Arterial Blood Pressure Measurement in a Population of Healthy Geriatric Dogs”. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*; **36**: 497-500.

Milne E.M., Doxey D.L. (1986) – “Alkaline phosphatase and its isoenzymes in the tissues and sera of normal dogs”. *Vet. Res. Commun.*; **10**: 229-236.

Mishina M., Watanabe T., Matsuoka S., Shibata K., Fujii K., Maeda H., Wakao Y. (1999) “Diurnal Variations of Blood Pressure in Dogs”. *J. Vet. Med. Sci.*; **61**: 643-647.

Mogensen C.E., “Microalbuminuria in prediction and prevention of diabetic nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus patients”. *J. Diab. Comp.*; **9**: 337-349.

Mulnix J.A., Rijnberk A., Hendricks H.J. (1976) – “Evaluation of modified water-deprivation test for diagnosis of polyuric disorders in dogs”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **169**: 1327-1330.

Muñana K.R. (1995)- “Long-term complications of diabetes mellitus, part I: retinopathy, nephropathy, neuropathy”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* ; **25**: 715-730.

Navalesi R., Rizzo L., Nannipieri M., Rapuano A., Bandinelli S., Pucci L., Bertacca A., Penno G. (1995) – “Ipertensione e diabete”. *Ann. Ital. Med. Int.*; **10**: 121S-129S.

Neiger R., Hurley K. (2001) – “Twenty-four-hour cortisol values in dogs with hyperadrenocorticism on trilostane”. *J. Small Anim. Pract.*; **42**: 376.

Neiger R., Ramsey I., O’Connor J., Hurley K.J., Mooney C.T. (2002) – “Trilostane treatment of 78 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism”. *Vet. Rec.* ; **150**: 799-804.

Nichols R. (1990) – “Concurrent illness and complications associated with canine hyperadrenocorticism”. *Probl. Vet. Med.* ; **2**: 565-572.

Nichols R. (1997) – “Complications and concurrent disease associated with canine hyperadrenocorticism”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **27**: 309-320.

Niebauer G.W., Eigenmann J.E., Van Winkle T.J. (1990) – “Study of long-term survival after transsphenoidal hypophysectomy in clinically normal dogs”. *Am. J. Vet. Res.*; **51**: 296-303.

Niebauer G.W., Evans S.M. (1988) – “Transsphenoidal hypophysectomy in the dog: A new technique”. *Vet. Surg.* ; **17**: 296-303.

Novellas R., De Gopegui R.R., Espada Y. (2007) – “Increased renal vascular resistance in dogs with hepatic disease”. *Vet. J.*; **XXX**: 1-6.

Nugent C.A., Warner H.R., Dunn J.T., Tyler F.H. (1964) – “Probability theory in the diagnosis of Cushing’s syndrome”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* ; **24**: 621-627.

Ortega T., Feldman E., Cowgill L., Nelson R., Feldman M. (1994) – “Evaluation of arterial blood pressure (BP) and urine protein creatinine ratio (UP/C) in dogs with canine cushin’s syndrome (CCS)”. (abstract). *J. Vet. Intern. Med.*; **8**: 164.

Ortega T., Feldman E.C., Nelson R.W., Feldman M. S. (1996) – “Plasma aldosterone concentrations in dogs before and after o’p’-DDT therapy for pituitary-dependent hyperadrenocorticism”. (abstract). *J. Vet. Intern. Med.*; **9** : 182.

Ortega T.M., Feldman E.C., Nelson R.W., Willits L.D., Cowgill L.D. (1996) – “Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* ;**209** : 1724-1729.

Ortega T.M., Feldman E.C., Nelson R.W., Willits N., Cowgill L.D. (1996) – “Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **209**: 1724-1729.

Osborne C.A., Stevens J.B., Lulich J.P., Ulrich L.K., Bird K.A., Koehler L.A., Swanson L.L. (1999) – “Valutazione clinica dell’analisi delle urine”. In Osborne C.A., Finco D.R.: Nefrologia e urologia del cane e del gatto. UTET: 141-206.

Palmer J.P., McCulloch D.K. (1991) – “Prediction and prevention of IDDM-1991”. *Diabetes*; **40**: 943-947.

Patterson J.E., Andriole V.T. (1997) – “Bacterial urinary tract infections in diabetes”. *Inf. Dis. Clin. North Am.*; **11**: 735-750.

Patterson J.S., Rusley M.S., Zachary J.F. (1985) - “Neurologic manifestations of cerebrovascular atherosclerosis associated with primary hypothyroidism in a dog”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **186**: 499-503.

Paulsen M.E., Allen T.A., Jaenke R.S., Ching S.V., Severin G.A., Hammond T. (1989) – “Arterial hypertension in two canine siblings: ocular and systemic manifestations. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*; **25**: 287-295.

Peikes H., Morris D.O., Hess R.S. (2001) – “Dermatologic disorders in dogs with diabetes mellitus: 45 cases (1986-2000)”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **219**: 203-208.

Peterson M.E. (1984) – “Hyperadrenocorticism”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **14**: 731-749.

Plotnik A.N., Greco D.S. (1995) – “Diagnosis of diabetes mellitus in dogs and cats”. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; **25**: 563-569.

Poggi M., Bergamasco L., Borgarelli M., Bussadori C. (2000) – “Regolazione della pressione arteriosa ed ipertensione nel cane e nel gatto: fisiologia, fisiopatologia, clinica e terapia. *Veterinaria*; **14**: 5-22.

Polzin D.J., Osborne C.A., Jacob F., Ross S. (2002) – “Insufficienza renale cronica”. In Ettinger S.J., Feldman E.C.; Trattato di clinica medica veterinaria: malattie del cane e del gatto. II ed., Delfino, Roma: 1634-1660.

Potts G.O., Creange J.E., Hardomg H.R., Schane H.P. (1978) – “Trilostane, an orally active inhibitor of steroidbiosynthesis”. *Steroids*; **32**: 257-267.

Pressler B.M., Vaden S.L., Jensen W.A., Simpson D. (2001) – Prevalence of microalbuminuria in dogs evaluated at a referral veterinary hospital”. (abstract). *J. Vet. Intern. Med.*; **15**: 300.

Pressler B.M., Vaden S.L., Jensen W.A., Simpson D. (2002) – “Detection of canine microalbuminuria using semiquantitative test strips designed for use with human urine”. *Vet. Clin. Pathol.*; **31**: 56-60.

Reaven G.M. (1988) – “Role of insulin resistance in human disease”. *Diabetes*; **37**: 1595-1988.

Remillard R.L., Ross J.N., Eddy J.B. (1991) – “Variance of indirect blood pressure measurements and prevalence of hypertension in clinically normal dogs”. *Am. J. Vet. Res.*; **52**: 561-565.

Reusch C.E. (2005) – “Hyperadrenocorticism”. In Ettinger S.J., Feldman E.C., eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine, 6th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders: 1592-1612.

Reusch C.E., Feldman E.C. (1991) – “Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41 dogs”. *J. Vet. Intern. Med.*; **5**: 3-10.

Rijnberk A., Belshaw B.E. (1988) – “An alternative protocol for the medical management of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism”. *Vet. Rec.*; **122**: 486-488.

Rindi G. (1990a) – “Lavoro e metabolismo cardiaci”. In Rindi G., Manni E.: Fisiologia umana. V ed., UTET, Torino: 856-864.

Rindi G. (1990b) – “Controllo nervoso del sistema cardiaco”. In Rindi G., Manni E.: Fisiologia umana. V ed., UTET, Torino: 865-882.

Ross L.A. (1999) – “Fisiopatologia e trattamento dell’ipertensione sistemica associata ad alterazioni della funzionalità renale”. In Osborne C.A., Finco D.R.; Nefrologia e urologia del cane e del gatto. UTET, Torino: 399-407.

Ruckstuhl N.S., Nett C.S., Reusch C.E. (2002) – “Results of clinical examinations, laboratory tests, and ultrasonography in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane”. *Am. J. Vet. Res.*; **63**: 506-512.

Sarafidis P.A. (2007) – “Proteinuria: natural course, prognostic implications and therapeutic considerations”. *Minerva Med.*; **98**: 693-711.

Sawicki P.T., Heinemann L., Berger M. (1989) – “Comparison of methods for determination of microalbuminuria in diabetic patients”. *Diab. Med.*; **6**: 412-414.

Scarpa P., Faverzani S., Di Fabio V., Ferro E., Pozza O. (2004b) – “Valutazione qualitativa della proteinuria: quale metodo?”. *Summa*; **7**: 31-38.

Scarpa P., Faverzani S., Ferro E. (2004a) – “La proteinuria: fisiopatologia ed approccio alla valutazione qualitativa. Albori in veterinaria e realtà in medicina umana”. *Summa*; **2**: 22-28.

Selman P.J., Mol J.A., Rutteman G.R., Rijnberk A. (1994) – “Progesterin treatment in the dog. Effects on insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *Eur. J. Endocrinol.*; **131**: 413-421.

Shellenberg S., Glaus T.M., Reush C.E. (2007) – “Effect of long-term adaptation on indirect measurements of systolic blood pressure in conscious untrained beagles”. *Vet. Rec.*; **22**: 418-421.

Smith F.W.K., Schrope D.P., Sammarco C.D. (2003) – “Disturbi cardiovascolari nelle malattie sistemiche”. In Tilley L.P., Goodwin J.K.: *Cardiologia del cane e del gatto*. Masson, Milano: 303-345.

Sowers J.R., Zemel M.B. (1990) – “Clinical implications of hypertension in the diabetic patient”. *Am J Hypertens*; **3**: 415-424.

Stepien R.L. e Rapoport G.S. (1999) – “Clinical comparison of three methods to measure blood pressure in nonsedated dogs”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **215**: 1623-1628.

Stepien R.L., Rapoport G.S., Henik R.A., Wenzholz L., Thomas C.B. (2003) – “Comparative Diagnostic Test Characteristics of Oscillometric and Doppler Ultrasonographic Methods in the Detection of Systolic Hypertension in Dogs”. *J Vet Intern Med*; **17**: 65-72.

Stickle J.E., Tvedten H.W., Schall W.D., Smith W. (1986) – “Adherence of neutrophils from dogs with diabetes mellitus”. *Am. J. Vet. Res.*; **47**: 541-543.

Struble A.L., Feldman E.C., Nelson R.W., Kass P.H. (1998) – “Systemic hypertension and proteinuria in dogs with diabetes mellitus”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **213**: 822-825.

Treadwell B.L., Sever E.D., Savage O., Copeman W.S. (1964) – “Side effects of long-term treatment with corticosteroids and corticotrophin”. *Lancet*; **23**: 1121-1123.

Tuck M.L. (1990) - "Metabolic considerations in hypertension". *Am. J. Hypertens.*; **3**: 355s-365s.

Umbreit A., Wiedemann G. (2000) – "Determination of urinary protein fractions. A comparison with different electrophoretic methods and quantitatively determined protein concentrations". *Clin. Chim. Acta.*; **297**: 163-172.

Vaden S.L., Jensen W.A., Longhofer S., Simpson D. (2001) – Longitudinal study of microalbuminuria in Soft-Coated Wheaten Terrier". (abstract). *J. Vet. Intern. Med.*; **15**:300.

Valtonen M.H., Eriksson L.M. (1970) – "The effect of cuff width on accuracy of indirect measurement of blood pressure in dogs". *Res Vet Sci*; **11**:358-361.

Van Liew C.H., Greco D.S., Salman M.D. (1997) – "Comparison of results of adrenocorticotropic hormone stimulation and low-dose dexamethasone suppression tests with necropsy findings in dogs: 81 cases (1985-1995)". *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **211**: 322-325.

Viberti G.C., Jarret R.J., Mahamud U., Hill R.D., Argyropoulos A., Keen H. (1982) – "Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus". *Lancet*; **1**:1430-1432.

Vincent I.C., Michell A.R., Leahy R.A. (1993) – "Non-invasive measurement of arterial blood pressure in dogs: a potential indicator for the identification of stress". *Res Vet Sci*; **54**: 195-201.

Waddell L.S. (2000) – "Direct Blood Pressure Monitoring"; *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*; **15**: 111-118.

Waters C.B., Adams L.G., Scott-Moncrieff J.C., DeNicola D.B., Snyder P.W., White M.R., Gasparini M. (1997) – “Effects of glucocorticoid therapy on urine protein-to-creatinine ratios and renal morphology in dogs”. *J. Vet. Intern. Med.*; **11**: 172-177.

Wehner A., Hartmann K., Hirschberger J. (2008) – “Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases”. *Vet. Rec.*; **162**: 141-147.

Weiser M.G., Spangler W.L., Gribble D.H. (1977) – “Blood pressure measurement in the dog”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **171**: 364-368.

Welbourn R.B., Montgomery D.A.D., Kennedy T.L. (1971) – “The natural history of treated Cushing’s syndrome”. *Br. J. Surg.*; **58**: 1-16.

White J.V., Oliver N.B., Reimann K., Johnson C. (1984) – “Use of protein-to-creatinine ratio in a single urine specimen for quantitative estimation of canine proteinuria”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **185**: 882-885.

Whittemore J.C., Gill V.L., Jensen W.A., Radecki S.V., Lappin M.R. (2006) – “Evaluation of the association between microalbuminuria and the urine albumine-creatinine ratio and systemic disease in dogs”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **229**: 958-963.

Xenoulis P.G., Suchodolsky J.S., Levinsky M.D. (2008) – “Serum liver enzyme activities in healthy Miniature Schnauzers with and without hypertriglyceridemia”. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; **232**: 63-67.

Zanatta R., Abate O., Borgarelli M., Iussich S., Tarducci A., Vittone V., Zatelli A. (2002) – “Valutazione qualitativa della proteinuria mediante elettroforesi per pesi molecolari su gel di agarosio (SDS-AGE) ai fini della localizzazione del danno renale”. *Atti SISVet. Giardini Naxos*; **56**: 301-302.

Zini E., Bonfanti U., Zatelli A. (2003) – “Correlazione tra proteinuria qualitativa ed istopatologia renale: ruolo diagnostico delle proteine a basso e ad alto peso molecolare nella definizione del danno tubulo interstiziale e glomerulare”. *Atti SCIVAC*. Milano; **46**: 407.