

Funzionalità renale, i biomarkers del futuro

Claudio Brovida, DMV, PhD

ANUBI[®] Ospedale per Animali da Compagnia

Articolo pubblicato ne *La Settimana Veterinaria* - N°900 - 24 dicembre 2014

Creatinina, peso specifico delle urine e proteinuria sono i parametri urinari ed ematici classicamente impiegati per valutare la funzionalità renale. Ma in questi ultimi anni, i ricercatori si sono ampiamente dedicati all'individuazione di biomarkers "non convenzionali" per una diagnosi precoce del danno renale acuto.

Tradizionalmente la valutazione della funzionalità renale si basa sulla corretta definizione, e possibilmente precoce, di alcuni parametri ematici e urinari: la creatinina, il peso specifico delle urine e la proteinuria. Questi ultimi due valori sono importanti nella definizione del danno renale cronico, come definito nella classificazione Iris: in particolare, il riscontro di valori anomali del rapporto proteine/creatinina urinarie può permettere un'indicazione di problemi renali cronici primari o secondari ad altre malattie in tempi molto precoci, quando il paziente può ancora non presentare alcuna alterazione clinica. Il peso specifico delle urine diminuisce quando il danno renale è più esteso e raggiunge i 2/3 circa della superficie renale complessiva. Con la perdita di capacità di concentrare le urine si ha poliuria e polidipsia compensatoria, sintomo classico della malattia renale cronica.

L'aumento di creatinina, parametro ematochimico tradizionalmente utilizzato per valutare la funzionalità renale, si manifesta dopo che un'estesa parte di superficie renale è danneggiata: affinché la creatinina sia costantemente al di sopra dei limiti di laboratorio di riferimento (1,4 mg/dl nel cane e 1,6 mg/dl nel gatto, sempre secondo la classificazione Iris), deve essere compromesso oltre il 75% dei nefroni. La creatinina, come valore di riferimento, è adeguatamente specifica, in quanto viene eliminata quasi esclusivamente per via glomerulare, mentre la frazione eliminata per via tubulare nel cane e nel gatto è irrilevante. La creatinina rappresenta in modo speculare l'andamento del filtrato glomerulare renale e per tale motivo viene usata nella pratica come valore di controllo del GFR (vedere figura 1). Tuttavia, l'aumento del valore ematico di creatinina si manifesta solamente di fronte a un esteso danno renale, pari al 75%, rendendo questo parametro affidabile, ma molto tardivo nella sua individuazione.

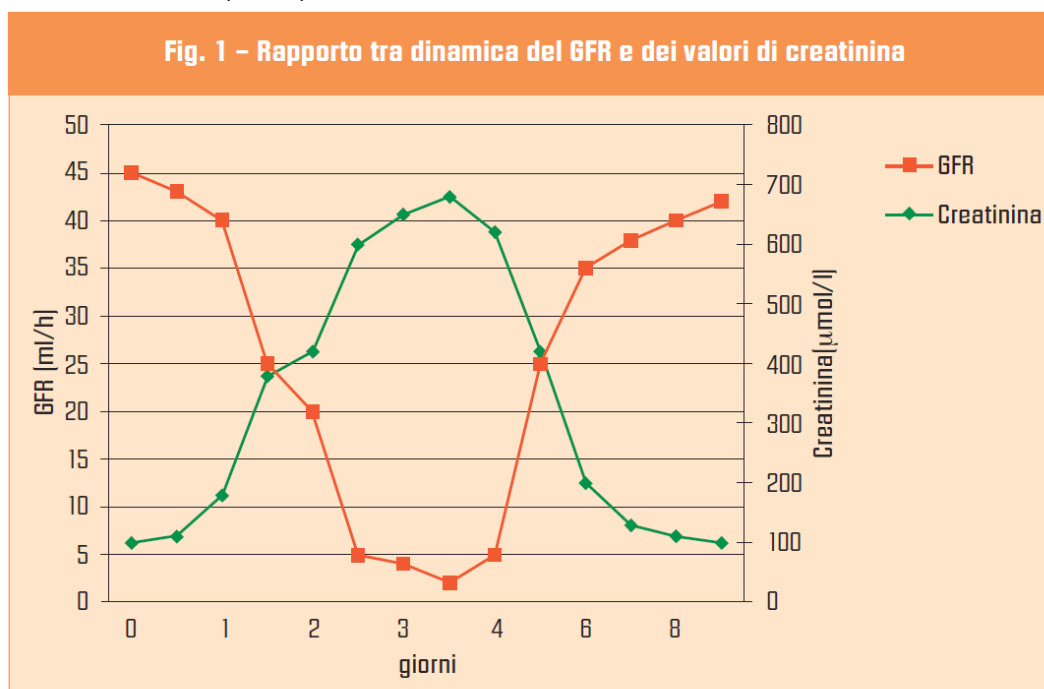


Grafico rappresentante il rapporto simmetrico fra la dinamica del GFR e dei valori di creatinina (qui rappresentati in µmol/l – per convertire il valore in mg/dl dividere per 88,4) si nota come alla progressiva diminuzione del GFR corrisponde l'aumento della creatinina e viceversa.

A ciò si aggiunge l'abitudine, ancora diffusa nella pratica, di non preoccuparsi particolarmente quando i valori sono appena al di sopra dei limiti di normalità, ma di aspettare valori anche 2-3 volte la normalità per definire il paziente come critico. Superati questi valori la superficie renale residua funzionante può essere veramente esigua.

Anche l'urea è condizionata dalla funzionalità renale; tuttavia, è un valore ematochimico meno specifico, in quanto influenzabile da numerosi fattori extrarenali, come il metabolismo proteico esogeno o endogeno, la funzionalità epatica, la presenza di sangue intestinale, lo stato di idratazione, la produzione di urine e l'uso di diuretici. Pertanto, l'urea viene considerata come un parametro collaterale alla creatinina per la valutazione dello stato uremico, sapendo che è meno specifico come marker della funzionalità renale.

Il problema assume una valenza completamente diversa in caso di danno acuto o AKI (Acute kidney injury). In generale, partendo da dati riportati in letteratura, l'indice di mortalità in AKI, sia negli esseri umani sia negli animali, si aggira attorno al 50% e l'esito della gestione del paziente dipende moltissimo dall'eziologia della malattia e dalle disponibilità terapeutiche, tenendo conto che questi valori di sopravvivenza prendono in considerazione anche la terapia sostitutiva renale. La creatinina aumenta in proporzione all'evoluzione del danno renale ed è condizionata da fattori pre- e post renali che possono interferire con una corretta valutazione dei valori. Ciononostante, la creatinina continua ad essere il principale strumento di valutazione clinica in caso di danno renale acuto. Recentemente, il Gruppo Iris ha elaborato una classificazione in gradi che permette di valutare la gravità dell'AKI nel cane e nel gatto. Questa classificazione si basa sulla stima accurata della variazione dei valori della creatinina e della produzione di urina, richiedendo un approccio non tradizionale all'interpretazione dei parametri e valutando lievi variazioni dei valori in tempi abbastanza ristretti (vedere tabelle 1 e 2).

Tab. 1 – Criteri Iris di gradazione dell'AKI o Iris AKI grading		
Grado AKI	Valore di creatinina sierica	Descrizione clinica del danno renale acuto (AKI)
Grado 1	< 1,6 (mg/dl)	Danno renale acuto non azotemico <ul style="list-style-type: none"> • Danno renale acuto documentato dall'indagine clinica, esami di laboratorio, diagnostica per immagini, oliguria/anuria reversibili con fluidoterapia¹; • progressivo aumento dei valori della creatinina sierica, $\geq 0,3$ mg/dl nell'arco di 48 ore; • oliguria misurata (produzione urina < 1 ml/kg/h) oppure anuria oltre 6 ore.
Grado 2	1,7 - 2,5 mg/dl	Danno renale acuto leggero <ul style="list-style-type: none"> • AKI documentata, azotemia statica o progressiva; • aumento progressivo della creatinina sierica, $\geq 0,3$ mg/dl nell'arco di 48 ore. Mancanza di risposta alla somministrazione di fluidi; • oliguria misurata (produzione urina < 1 ml/kg/h) oppure anuria oltre 6 ore.
Grado 3	2,6 - 5,0 mg/dl	Danno renale acuto da moderato a grave <ul style="list-style-type: none"> • AKI documentata, gravità dell'azotemia e dell'insufficienza funzionale renale documentate.
Grado 4	5,1 - 10,0 mg/dl	
Grado 5	> 10,0 mg/dl	

¹ La oliguria/anuria viene definita reversibile con fluidi se si ottiene un aumento della produzione di urine maggiore a 1 ml/kg/h oltre 6 ore e/o un abbassamento dei valori di creatinina sierica a livelli di normalità oltre 48 ore.

Tab. 2 – Sottogradazione della classificazione Iris AKI sulla base della oligo-anuria e sulla necessità di terapia sostitutiva renale		
Grado AKI	Valore di creatinina sierica	Sottogrado
Grado 1	< 1,6 mg/dl	Ogni grado di danno renale acuto (AKI) viene ulteriormente classificato mediante sub-gradazioni basate su: 1. Non oligurico (NO) o Oligo-anuria (O); 2. necessità di terapia renale sostitutiva (RRT).
Grado 2	1,7 - 2,5 mg/dl	
Grado 3	2,6 - 5,0 mg/dl	
Grado 4	5,1 - 10,0 mg/dl	
Grado 5	> 10,0 mg/dl	

Variazioni nella produzione e concentrazione dell'urina sono fra i parametri più antichi utilizzati clinicamente. Tuttavia, entrambi sono poco sensibili e specifici. Certi tipi di AKI non sono necessariamente associati a oliguria e, quindi,

possono essere sottovalutati nelle fasi iniziali. Inoltre, la valutazione della produzione di urina può essere di non facile definizione, soprattutto nei gatti. L'oliguria in caso di danno renale acuto costituisce un indicatore predittivo negativo rispetto alla non oliguria. D'altro canto, il passaggio da fase anurica-oligurica a una fase di AKI non oligurico rappresenta il traguardo diagnostico più importante della terapia medica, basata sulla terapia fluida endovenosa e l'uso di diuretici, come la furosemide, a dosi progressive, o il mannitolo. L'impiego di farmaci vasoattivi come la dopamina non sono di utilità e la loro inefficacia è stata abbondantemente dimostrata scientificamente. Va sottolineato che, in caso di anuria persistente nonostante queste terapie, non ha senso insistere oltre le 24-36 ore, poiché il rischio di morte è molto elevato. L'unica possibilità terapeutica è la terapia sostitutiva renale.

In caso di possibilità di ricovero, la funzionalità renale può essere monitorata attentamente, valutando la stima del GFR, sulla clearance urinaria o sulla clearance del plasma di appropriati markers di filtrazione endogeni od esogeni (normalmente creatinina o ioexolo). Tuttavia, la necessità di prelievi ematici multipli e lo scarso numero di laboratori che eseguono tale test ha reso poco comune la stima del GFR nella pratica quotidiana. Più semplice da valutare è la clearance della creatinina endogena, che si basa su un'accurata misurazione della produzione di urina a intervalli ben definiti (da 30 minuti ad alcune ore) e sul prelievo di sangue a metà del tempo di misurazione della produzione di urina. In caso di pazienti ricoverati con cateterismo permanente, la valutazione del GFR è un buon metodo per controllare l'andamento della funzionalità renale.

La clearance della creatinina è nota applicando la seguente formula:

$$\text{Clearance}_{\text{Crea}} = (\text{Creatinina urinaria} \times \text{volume urine}) / \text{Creatinina plasmatica}$$

Dove la creatinina ematica e urinaria è espressa in mg/dl e il volume delle urine in ml.

Nuovi (non tradizionali) marcatori o biomarkers per il danno renale acuto

È in costante crescita l'interesse sulla ricerca in Medicina umana e, recentemente, anche in veterinaria, di nuove molecole, di nuovi marcatori o biomarkers che consentano l'individuazione, in modo sensibile e specifico, dell'insorgere precoce del danno renale acuto. Alcuni di questi marcatori stanno riscuotendo particolare interesse in veterinaria.

Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)

La gamma-glutamyl transpeptidasi è localizzata a livello delle cellule epiteliali tubulari prossimali e può essere individuata nelle urine. A causa della sua instabilità, necessita di una valutazione immediata dopo la sua raccolta e di conseguenza ne limita l'utilità pratica. È un marcatore conosciuto da tempo e studiato nel cane in corso di AKI indotta sperimentalmente mediante la somministrazione di gentamicina.

L'aumento di GGT è stata documentata fin dal primo giorno mentre la creatinina sierica è aumentata al settimo giorno dopo l'inizio dello studio. Questo studio indica la GGT come marcatore precoce del danno tubulare.

N-acetil-β-glucosaminidase (NAG)

Il NAG è un enzima lisosomiale del tubulo prossimale. In caso di danno renale, il rapporto NAG/creatinina nelle urine aumenta e può essere usato come marcatore del danno renale.

Un aumento dei livelli di NAG è stato dimostrato in pazienti umani con nefrotossicità, in situazione di ritardo di funzionalità da trapianto renale e dopo procedure di bypass cardiopolmonare (situazione clinico-chirurgica favorita per la valutazione dei biomarkers renali in Medicina umana). È anche stato dimostrato che precede l'aumento del valore di creatininemia da 12 ore a 4 giorni. Tuttavia, il NAG può aumentare anche in caso di altre patologie (ad esempio, artrite reumatoide, ipertiroidismo); pertanto, la sua specificità è bassa e soggetta alla valutazione di falsi positivi.

Microglobuline α1 e β2

La microglobulina β2 è una proteina di 11,8 kDa, espressa sulla superficie cellulare di tutte le cellule nucleate. È filtrata specificamente dal glomerulo e riassorbita in modo quantitativo a livello dei tubuli prossimali. È stato dimostrato che è in grado di indicare un precoce danno tubulare in diverse situazioni, come l'esposizione a sostanze tossiche tubulari, cardiocirurgia e trapianti renali. La microglobulina β2 anticipa l'aumento di creatinina ematica di 4-5 giorni; tuttavia, in termini di impiego pratico, il suo punto debole è l'elevata instabilità nelle urine. La microglobulina α1 è una proteina di circa 30 kDa, sintetizzata a livello epatico e la sua forma libera viene prontamente filtrata a livello glomerulare e

altrettanto prontamente riassorbita a livello tubulare. In condizioni di normalità, questa microglobulina è assente nelle urine. È una molecola stabile e, quindi, potrebbe essere utilizzata come marker di disfunzione dei tubuli renali prossimali. Il suo punto debole è dovuto al fatto che è influenzata da numerose situazioni cliniche patologiche (ad esempio, malattie epatiche) che alterano il livello plasmatico e sierico e, quindi, ne riducono la specificità.

Proteina legante il retinolo o Retinol binding protein (RBP)

Si tratta di una proteina di 21 kDa, sintetizzata nel fegato, filtrata liberamente dal glomerulo e successivamente riassorbita e catabolizzata a livello del tubulo prossimale. La RBP è molto sensibile come fattore predittivo della disfunzione tubulare, precedendo l'escrezione urinaria di NAG. Come per altri biomarkers, i livelli sierici di RBP possono essere influenzati da altri fattori, con conseguente aumento del rischio di falsi positivi. La RBP è stata studiata in cagne con piometra come marker tubulare prossimale: il 6% di 17 soggetti inclusi nello studio, ha dimostrato un aumento della molecola nelle urine, in assenza di azotemia, rivelandosi più efficace di altri marcatori nella definizione delle fasi iniziali dell'AKI di grado I.

Cistatina-C

È una proteina di 13 kDa, proteasi inibitore della cisteina, studiata abbastanza estesamente come marker dell'AKI nell'uomo. A differenza della creatinina, non è influenzata dal sesso, dall'età o dalla massa muscolare; pertanto, è considerata un marker specifico della funzionalità renale. A causa del suo basso peso molecolare, la cistatina-C viene filtrata liberamente dal glomerulo.

Successivamente viene riassorbita e catabolizzata, ma non secreta dai tubuli. Sia la cistatina-C urinaria sia quella sierica sono indicatori sensibili del danno renale acuto e precedono l'indicazione dell'AKI fino a due giorni prima delle variazioni di creatinina. Inoltre, le variazioni di valori di cistatina-C sono correlabili alle valutazioni prognostiche per l'AKI.

Molecola-1 del danno renale o Kidney injury molecule-1 (KIM-1)

Si tratta di una glicoproteina di tipo 1 della membrana cellulare. È sostanzialmente sovraregolata in caso di AKI, risultando un indicatore sensibile del danno tubulare. Nell'uomo, è stata riscontrata a elevati livelli nelle urine 12 ore dopo un danno renale, prima della comparsa di cilindri nel sedimento urinario o l'aumento della creatinina urinaria. Ha dimostrato valore predittivo prognostico e, sempre nell'uomo, valori elevati di KIM-1 sono associati a un rischio di morte o alla necessità di ricorrere alla terapia sostitutiva renale. Pertanto, in nefrologia umana, è diventata una molecola di uso routinario nella valutazione prognostica delle fasi iniziali di AKI. Purtroppo, la tecnologia diagnostica attuale non è in grado di identificare la KIM-1 nel cane.

Questo può indurre a pensare che il cane non produce KIM-1 come i roditori o, più semplicemente, la metodologia diagnostica disponibile è insensibile a un'eventuale KIM-1 canina.

Lipocaina associata a gelatinasi neutrofilica o Neutrophil gelatinase-associated lipocain (NGAL)

Si tratta di una proteina di 25 kDa, inizialmente identificata come legata all'enzima gelatinasi in particolari granuli dei neutrofili. Successivamente, è stato dimostrato che viene espressa da una varietà di epitelii. La NGAL è sovraregolata (più di dieci volte) a seguito di danni renali tossici, ischemici ed ostruttivi, sia in modelli sperimentali di AKI sia in situazioni di danno renale naturale nell'uomo e nel cane. È stato dimostrato che questa proteina aumenta in numerosi processi infiammatori e viene filtrata dai glomeruli e, quindi, è riscontrabile nelle urine. Studi recenti su cani con danno nefrotossico sperimentale e cani con AKI acquisito naturalmente hanno dimostrato che il NGAL presenta sensibilità e specificità superiori al 95%. È disponibile un test commerciale per valutare la NGAL nel cane (Abbott Laboratories), validato per l'AKI. La NGAL urinaria rappresenta a oggi il marcatore urinario più promettente nella pratica clinica.

Interleuchina-18 (IL-18)

Si tratta di una citochina che interviene in numerose situazioni patologiche infiammatorie. Viene espressa anche a livello dell'epitelio tubulare distale e i suoi valori aumentano in caso di AKI. È anche stato dimostrato che la concentrazione aumenta in caso di ritardo funzionale del rene trapiantato, comparabile ad altri disturbi urinari come l'azotemia pre-renale, un'infezione delle vie urinarie, la CKD (Chronic kidney disease) e la sindrome nefrosica. In uno studio eseguito su uomini adulti con sindrome acuta respiratoria, i valori urinari di IL-18 sono risultati essere un indicatore precoce di AKI, precedendo l'aumento della creatinemia di 1-2 giorni.

Dimetil arginina simmetrica sierica o Symmetric dimethylarginine (SDMA)

La dimetil arginina simmetrica nel siero è una delle ultime molecole su cui si è concentrata l'attenzione dei ricercatori e viene considerata un promettente marker della funzionalità renale. La SDMA deriva dai processi di degradazione delle proteine tramite idrolisi e successiva metilazione, in cui si producono aminoacidi metilati, biologicamente attivi, fra cui appunto, l'arginina metilata, di cui vi sono tre specie principali: monometilarginina (Monomethyl arginine, MMA), dimetilarginina asimmetrica (Asymmetric dimethylarginine ADMA) e SDMA.

In particolare, questa molecola riduce per via indiretta la sintesi di ossido nitrico (ON). Un'altra caratteristica è associata al fatto che la SDMA viene escreta primariamente, per più del 90%, mediante clearance renale e, in caso di danno renale con diminuzione del GFR, si accumula nel siero ematico. La ricerca nell'uomo ha dimostrato che la dimetil arginina simmetrica è un accurato e preciso marcatore per la stima del GFR e presenta una maggiore sensibilità rispetto alla creatinina nella valutazione della funzione renale. Analogamente, sono stati effettuati studi nel gatto e nel cane con risultati molto promettenti. Lavori sul gatto hanno dimostrato che, in gatti anziani con diminuito GFR, aumenta il valore di SDMA nel siero, a differenza della creatinina; pertanto, nel gatto, questa molecola permetterebbe una diagnosi della malattia renale cronica (CKD) più precoce rispetto alla creatinina ematica. Analogamente, un recente studio su cani anziani sani ha dimostrato che la concentrazione sierica di SDMA è un indicatore sensibile della variazione della funzionalità renale nel cane, senza essere influenzato dalla variazione di massa muscolare (come invece avviene per la creatinina).

Infine, un ultimo studio retrospettivo condotto su 8 cani indicherebbe che la SDMA sierica permette di diagnosticare il danno renale cronico nel cane prima della creatinina.

Quindi... per concludere

Si sta avvicinando il momento in cui la possibilità di effettuare una diagnosi precoce del danno renale potrà essere anticipata di ore o di giorni grazie all'uso di nuovi marcatori. Sembra che questi nuovi biomarkers siano anche in grado di migliorare la valutazione della progressione della malattia renale nella sua dinamica di variazione del GFR, senza dover ricorrere a tecniche già disponibili ma non di pratica utilizzazione nella clinica quotidiana.

Per saperne di più

- **Greco DS, Turnwald GH, Adams R, et al.** Urinary gamma-glutamyl transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Am. J. Vet. Res.*, 1985; 46:2332-2335.
- **Maddens B, Heiene R, Smets P, et al.** Evaluation of kidney injury in dogs with pyometra based on proteinuria, renal histomorphology, and urinary biomarkers. *J. Vet. Intern. Med.*, 2011; 25:1075-1083.
- **Segev G, Palm C, LeRoy B, Cowgill LD, Westropp JL.** Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of kidney injury in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 2013; 27:1362-1367.
- **Jepson RE, Syme HM, Vallance C, et al.** Plasma asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, arginine, and nitrite/nitrate concentrations in cats with chronic kidney disease and hypertension. *J. Vet. Intern. Med.*, 2008; 22:317-324.