

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA
in Clinica e Terapia d'urgenza Veterinaria
XXIII Ciclo

**Settore scientifico disciplinare di afferenza: Area 07 – Scienze Agrarie e
Veterinarie**
VET/08 Clinica Medica Veterinaria

**Influenza dei corticosteroidi endogeni ed esogeni
sulle proteine di fase acuta nel cane.**

Presentata da: **Dott.ssa Edy Mercuriali**

Coordinatore:
Prof. Antonio Venturini

Tutor
Prof. Gualtiero Gandini

Esame finale anno 2011

Introduzione

La risposta di fase acuta è stata ampiamente studiata in Medicina Umana e già da alcuni anni le proteine di fase acuta (APPs) sono parte integrante dei profili ematobiochimici di base. Tali proteine sono marker estremamente precoci e sensibili e possono, di conseguenza, risultare particolarmente utili per il clinico nella diagnosi e nel monitoraggio di molteplici processi patologici. La risposta di fase acuta si esplica, infatti, prima della manifestazione dei segni clinici e le concentrazioni ematiche delle APPs variano prima che altri marker risultino alterati. L'utilizzo delle proteine di fase acuta negli animali da affezione ha iniziato a diffondersi solo nell'ultimo decennio, apportando di anno in anno nuove conoscenze in merito alla loro applicazione nella pratica clinica veterinaria, tuttavia non si conoscono ancora molti aspetti sulle loro funzioni biologiche, sulla loro cinetica in corso di numerose patologie e sui fattori laboratoristici e fisiopatologici che ne possono influenzare la concentrazione. In letteratura, in particolare, sono ancora in numero limitato gli studi che descrivono l'influenza dei farmaci e degli ormoni endogeni ed esogeni sulle concentrazioni di tali proteine e non si conosce in che modo essi possano alterare i risultati e portare ad una scorretta interpretazione dei dati da parte del clinico. I corticosteroidi, ad esempio, sia endogeni che esogeni, sembrano influenzare in modo significativo la risposta di fase acuta nel cane, aspetto che sta suscitando l'interesse di un numero sempre più crescente di Autori in Medicina Veterinaria.

Lo scopo del nostro studio è quello di valutare la presenza o meno di una influenza dei corticosteroidi esogeni ed endogeni su alcune proteine di fase acuta, la proteina C-reattiva e l'Aptoglobina, e valutare l'entità di tale influenza.

Il presente studio è stato sviluppato in due parti, la valutazione di tali proteine in cani affetti da ipercortisolismo spontaneo prima e dopo la terapia con trilostano e la

determinazione delle stesse proteine in un gruppo di cani affetti da differenti patologie, in cui non era presente un ipercortisolismo spontaneo, ma in cui si mostrava la necessità di intervenire con la somministrazione di corticosteroidi esogeni.

Lo studio è stato condotto in parte retrospettivamente ed in parte in modo prospettivo.

CAPITOLO 1

La risposta di fase acuta

1.1 INTRODUZIONE

Descritta per la prima volta da Fahraeus nel 1921, la risposta di fase acuta (APR) è una reazione complessa ed aspecifica che si verifica subito dopo un insulto tissutale. La APR è considerata una componente del sistema di difesa innato, il quale è responsabile della sopravvivenza del soggetto durante il primo e critico periodo dopo l'insulto e precede la risposta del sistema immunitario acquisito (Eckersall, 2000). È definita come il “termometro molecolare” in quanto la valutazione di essa permette di avere un quadro della risposta all'evento scatenante (Cray et al, 2009).

1.2 LA RISPOSTA DI FASE ACUTA (APR)

La risposta di fase acuta è descritta in numerose specie animali, dai mammiferi agli invertebrati, ai pesci e in questi ultimi si suppone che la APR sia particolarmente sviluppata per compensare un sistema immunitario adattativo meno evoluto (Armstrong e Quigley, 1999; Raida e Buchmann, 2009). Nei mammiferi, ogni qual volta l'organismo venga sottoposto ad un insulto, sia esso di origine infiammatoria, traumatica, neoplastica o immunomediata, si scatena una reazione sistemica aspecifica volta a ristabilire l'omeostasi e a rimuovere la causa del disturbo. Tale condizione viene definita “risposta di fase acuta” (APR), fa parte del sistema immunitario innato e prevede una

serie di complessi cambiamenti fisiopatologici sia locali che sistemici (Figura 1.1).

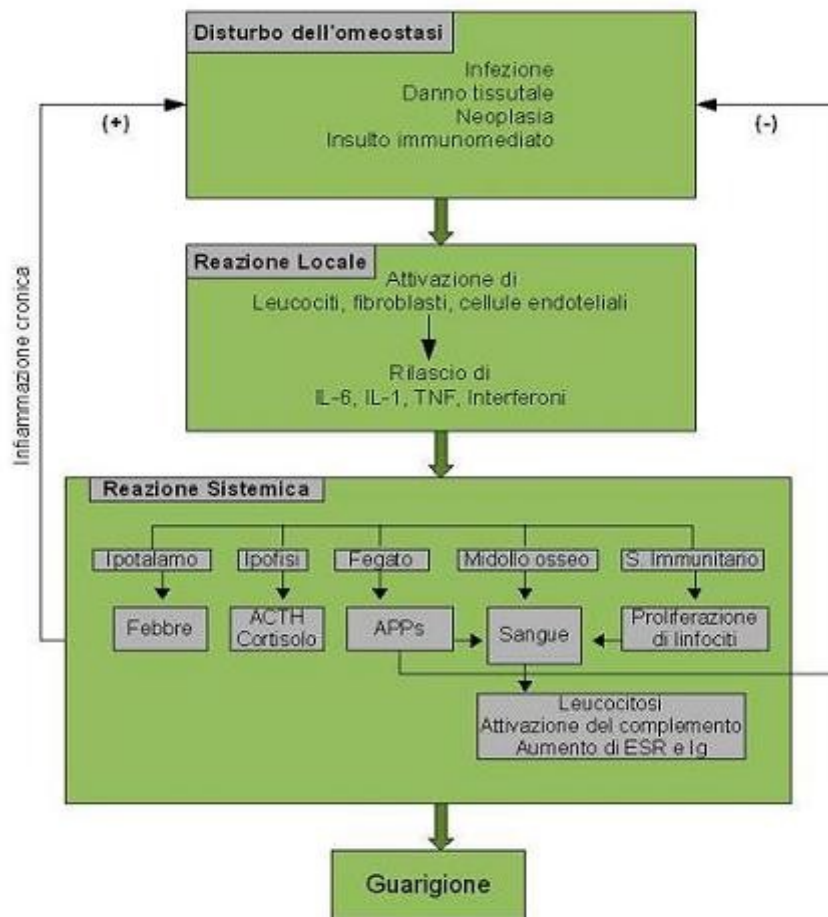


Figura 1.1: risposta di fase acuta dell'organismo (Modificato da Heinrich et al, 1990).

1.2.1 REAZIONE LOCALE e SISTEMICA

La **reazione locale** dell'organismo è confinata al sito in cui avviene l'insulto e prevede ad esempio l'aggregazione piastrinica, la formazione del coagulo, la dilatazione dei vasi sanguigni e l'accumulo e l'attivazione di granulociti e di cellule mononucleate che a loro volta rilasciano citochine di fase acuta. Inoltre, anche i fibroblasti attivati e le cellule endoteliali sono in grado di produrre citochine. Questi mediatori agiscono su specifici recettori di diverse cellule "target", scatenando una **reazione sistemica** caratterizzata da febbre, leucocitosi, aumento dell'indice di eritrosedimentazione, aumento della secrezione di ACTH e glucocorticoidi, dall'attivazione del complemento e della cascata coagulativa, dalla diminuzione delle

concentrazioni ematiche di zinco e ferro, ma soprattutto da un'importante variazione della concentrazione di oltre 200 proteine plasmatiche: le cosiddette “proteine di fase acuta” (APPs) (Eckersall e Conner, 1988; Cray e al, 2009).

1.2.2 LE CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE

La risposta di fase acuta, quindi, è indotta da ormoni proteici chiamati citochine, che agiscono come messaggeri tra il sito locale dell'insulto e gli epatociti sintetizzanti le APPs (Petersen et al, 2004). Tali citochine proinfiammatorie sono numerose e hanno diverse origini e differenti “target” e funzioni (Petersen et al, 2004); sono secrete principalmente dai monociti, vengono attivate dalle tossine batteriche o in risposta al danno tissutale locale e diffondono nel circolo ematico dove possono essere rilevate “a picchi”, cioè in modo pulsatile (Petersen et al, 2004); agiscono insieme attraverso numerose vie sovrapposte, hanno sia effetti locali sulle cellule che circondano il sito danneggiato, che effetti sistemici tramite il trasporto attraverso il circolo ematico ai vari organi target (Baumann e Gauldie, 1994); subiscono un aumento di concentrazione sierica poche ore dopo l'inizio dello stimolo e spariscono dal circolo in poche ore (Petersen et al, 2004). Tali citochine possono essere divise in due grandi gruppi: le citochine tipo IL-1 che includono IL-1 e TNF- α e le citochine tipo IL-6 che comprendono l'IL-6; questi due gruppi agiscono su differenti recettori localizzati sulla membrana degli epatociti (Petersen et al, 2004). Le citochine tipo IL-1 rappresentano un segnale primario autostimolatorio scatenando il rilascio, in vari tipi di cellule, di citochine di tipo IL-6 che fungono da segnale citochinico secondario. Queste ultime, inoltre, sembrano esercitare un feed-back negativo sulla produzione di citochine tipo IL-1.

Alcuni autori hanno suddiviso le APPs in 2 gruppi in base al tipo di citochina che ne stimola la sintesi durante la risposta di fase acuta:

- le APPs di tipo 1 sono stimulate dalle citochine tipo IL-1, tuttavia la loro sintesi è stimolata sinergicamente dalla IL-6 (CRP, Hp, SAA, AGP).
- Le APPs di tipo 2 sono stimulate dalle citochine tipo IL-6, non sono ne indotte ne stimulate dalla IL-1, anzi, essa può essere addirittura inibitrice di alcune APPs di tipo 2 (Fibrinogeno, Hp umana, Cp).

I mediatori che permettono l'attivazione della reazione sistemica hanno catturato l'attenzione di molto Autori sia in Medicina Umana che Veterinaria, tuttavia non è ancora stato descritto tutto il complesso meccanismo nei suoi dettagli più profondi. Le citochine implicate nella APR sono diverse, tuttavia l'interleuchina-6 (IL-6) sembra giocare un ruolo dominante.

1.2.2.1 L'interleuchina-6 (IL-6)

Studiata fin dal 1951, l'IL-6 è la maggior regolatrice della risposta di fase acuta nell'uomo; è **sintetizzata** da diverse cellule dell'organismo come i macrofagi, i fibroblasti e le cellule endoteliali ed **agisce** direttamente sulle cellule B a sua volta attivate da IL-4 e IL-5, inducendo la produzione di immunoglobuline M, G ed A. L'IL-6 non agisce sulle cellule B a riposo, in quanto tali cellule esprimono il recettore per l'IL-6 solo quando sono in forma attivata e quindi possono rispondere all'IL-6 producendo e secernendo anticorpi. La secrezione di IL-6 è anche controllata dai corticosteroidi, il desametasone, infatti, è stato descritto come inibitore della produzione di IL-6 nei monociti (Woloski et al, 1985). Questa citochina in vivo agisce su numerose cellule “target”, tuttavia gli epatociti sono le maggiormente coinvolte. Attraverso un complesso meccanismo, quindi, l'IL-6 stimola gli epatociti alla sintesi di proteine di fase acuta. IL-1 e TNF- α , invece, stimolano i fibroblasti, le cellule endoteliali e i cheratinociti a sintetizzare IL-6 e, in questo modo, ad amplificare la sua attività biologica. È stato dimostrato che IL-1, IL-6 e TNF- α stimolano il rilascio di ACTH dalle cellule pituitarie, comportando un aumento del rilascio di glucocorticoidi da parte delle cellule

surrenaliche. I glucocorticoidi da una parte aumentano l'effetto stimolatorio delle citochine sulla sintesi delle proteine di fase acuta da parte degli epatociti, dall'altra inibiscono la sintesi di citochine. La misurazione delle citochine può essere usata per quantificare la risposta sistemica indotta da una infezione o da una infiammazione, tuttavia la misurazione delle APPs è stata proposta come una valida alternativa (Eckersall et al., 1999b).

1.2.2.2 L'interleuchina-10 (IL-10)

L'interleuchina-10 (IL-10) fa parte di un gruppo di proteine solubili alpha-elicali secrete principalmente da monociti attivati e cellule-T (Fickenscher et al, 2002), è un soppressore della risposta immunitaria e dell'attività infiammatoria attraverso l'induzione di Cellule-T regolatrici in diverse specie (Moore et al, 2001). Studi recenti in medicina Umana, suggeriscono che il principale dato determinante per l'outcome in corso di un processo infiammatorio sistemico può essere uno squilibrio nella regolazione del sistema pro-infiammatorio e il sistema compensatorio anti-infiammatorio dell'ospite (Carrigan et al, 2004). Sia un sovra-compensazione che una sotto-compensazione sembrano essere correlate ad un outcome peggiore ed è stato osservato, nell'uomo, che un rapporto IL-6:IL-10 alto, il quale indica una relativa deficienza di IL-10, può contribuire allo sviluppo di una disfunzione multiorganica (Loisa et al, 2003). È stato dimostrato che una sovrapproduzione della citochina anti-infiammatoria IL-10 è il principale marker di cattiva prognosi nell'uomo con sepsi grave (Gogos et al, 2000). L'IL-10 nell'uomo inizia ad aumentare circa 6 ore dopo lo stimolo e raggiunge il picco massimo intorno alle 24 ore (Bjerre et al, 2004). Nel cane, L'IL-10 è stata clonata e sequenziata ed è una proteina caratterizzata da 162 aminoacidi, probabilmente glicosilati (Lu et al, 1995), tuttavia, a differenza che nell'uomo, non è risultata utile in corso di patologie infiammatorie. Soggetti con piometra, con angiostrongilosi o sottoposti ad un intervento chirurgico, non hanno mostrato concentrazioni significativamente differenti rispetto ai cani sani (Kjelgaard-Hansen et

al, 2007), inoltre le concentrazioni ematiche di IL-10, in cani con una APR in atto, non sono correlate alle concentrazioni della proteina C-reattiva (Kjelgaard-Hansen et al, 2007).

1.2.3 VARIAZIONI METABOLICHE

In aggiunta agli effetti sul sistema nervoso e immunitario, le IL-1, IL-6 e TNF- α agiscono sul muscolo scheletrico promuovendo il catabolismo muscolare e mobilizzando un pool di aminoacidi disponibili. Nonostante questo possa causare danno muscolare, i nuovi aminoacidi risultano disponibili per la sintesi di anticorpi. Altre risposte sistemiche comprendono lo sviluppo di febbre, leucocitosi, aumento della cortisolemia e diminuzione della tiroxina, perdita di peso e produzione di nuove proteine che aiutano a combattere l'infezione, le cosiddette “proteine di fase acuta”.

1.3 LE PROTEINE DI FASE ACUTA

Le proteine di fase acuta (APPs) sono parte integrante della risposta di fase acuta, vengono sintetizzate principalmente dagli epatociti, tuttavia sembra che la loro produzione possa essere attribuita anche ad altri organi (Cerón et al, 2005). Pur variando in cinetica e caratteristiche strutturali da specie a specie, hanno, in tutto il regno animale, il pregio di essere parte di una risposta estremamente rapida che si instaura in molti casi prima della manifestazione dei segni clinici. Per tale motivo, possono essere considerate i più precoci marker per numerosi processi patologici (Cerón et al, 2005), tuttavia, occorre tenere presente che sono altamente non-specifici e che le condizioni che possono scatenare un loro aumento possono essere di varia natura.

1.3.1 FUNZIONI BIOLOGICHE

La risposta di fase acuta è considerata parte della risposta di difesa al danno tissutale e in linea generale è caratterizzata da numerose funzioni biologiche esercitate dalle proteine di fase acuta, per esempio l'Hp lega l'Hb rilasciata dal danno eritrocitario ed insieme con l'emopexina e la transferrina aiutano ad alleviare gli effetti dannosi del ferro libero e a diminuire la disponibilità di ferro per batteri invasori (Petersen et al, 2004). Le numerose funzioni biologiche delle APPs verranno descritte in seguito in modo più dettagliato (Capitolo 2).

1.3.2 MAGNITUDO E CINETICA

Sotto l'influenza di IL-1, TNF- α e soprattutto IL-6, le cellule epatiche aumentano la sintesi e la secrezione proteica, la loro risposta comincia poche ore dopo l'insulto e solitamente dura 24-48 ore. I livelli di queste proteine possono aumentare enormemente in seguito ad uno stimolo appropriato. Poiché questa sintesi è associata ad infiammazioni ed infezioni acute, queste proteine sono definite **PROTEINE DI FASE ACUTA (APPs)**. Molte di queste sono componenti del sistema immunitario innato ed includono componenti del complemento, molecole della coagulazione, inibitori delle proteasi e proteine leganti ferro. Le APPs vengono classificate in **“positive”** e **“negative”** a seconda che la loro concentrazione rispettivamente aumenti o diminuisca in corso di risposta di fase acuta.

| APPs NEGATIVE | APPs POSITIVE |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| Albumina | Proteina C-reattiva (CRP) |
| Transferrina | Seroamiloide A (SAA) |
| Transtiretrina (TTR o prealbumina) | Aptoglobina (Hp) |
| Proteina legante il retinolo (RBP) | Fibrinogeno (Fb) |
| Globulina legante il cortisolo | α -1-glicoproteina acida (AGP) |
| | Ceruloplasmina |

Tabella 1.1: alcuni esempi di APPs negative e positive.

Le APPs positive vengono ulteriormente suddivise in maggiori, moderate o minori in dipendenza della loro magnitudo di aumento.

- Le concentrazioni ematiche delle **APPs maggiori** aumentano di 10-100 volte, fino anche a 1000 volte rispetto ai valori basali (Eckersall, 2000). Queste proteine aumentano in modo cospicuo nelle prime 48 ore dopo l'insulto e solitamente hanno un altrettanto rapido declino.
- Le **APPs moderate** aumentano di 2-10 volte rispetto ai valori basali e necessitano di tempi più lunghi per aumentare e anche per ritornare ai valori normali, hanno quindi un declino più graduale rimanendo elevate per più di 2-3 settimane dopo la fine del meccanismo scatenante (Gabay e Kushner, 1999; Petersen et al, 2004).
- Le **APPs minori** sono caratterizzate da un graduale aumento in corso di risposta di fase acuta di circa 50%-100% il loro valore basale (Eckersall e Bell, 2010).

| APPs | Causa dell'insulto | Magnitudo della risposta | Tempo necessario per | Tempo necessario |
|------|--------------------|--------------------------|----------------------|------------------|
|------|--------------------|--------------------------|----------------------|------------------|

| | | | individuare un aumento significativo | per il picco di massima concentrazione |
|-----------------------------------|---|---------------------|---|---|
| Proteina C-reattiva | Trauma chirurgico | 95 X | 4 ore | 24 ore |
| | Iniezione di olio turpentine | 40-50 X | - | 48 ore |
| | Dose intravenosa di lipopolisaccaride di Escherichia coli | 23 X | 4 ore | - |
| Seroamiloide A | Infeazione sperimentale con parvovirus | 30-800 X | 5 giorni | 7 giorni |
| | Dose intravenosa di lipopolisaccaride di E. coli | 525 X | 2 ore | - |
| Aptoglobina | Trauma chirurgico | 2-3 X | 24 ore | 3-4 giorni |
| Alfa 1 glicoproteina acida | Infeazione sperimentale con parvovirus | 2-5 X | 5 giorni | 7 giorni |
| | Iniezione di olio turpentine | 2-3 X | - | 3 giorni |
| Ceruloplasmina | Trauma chirurgico | 2-3 X | 24 ore | 4 giorni |
| Albumina | Iniezione di olio turpentine | Diminuzione del 50% | - | 5 giorni |

Tabella 1.2: magnitudo e cinetica delle differenti APPs in seguito a differenti stimoli nel cane (Modificato da: Cerón et al, 2005).

1.3.3 DIFFERENZE DI SPECIE

È importante ricordare che esistono sostanziali differenze nelle diverse specie. Ad esempio la Proteina C-reattiva (CRP) è una APPs maggiore nell'uomo, nel cane e nel suino. Nei ruminanti, invece, la concentrazione sierica della CRP difficilmente risulta alterata in corso di infezioni o infiammazioni. Al contrario, l'Aptoglobina (Hp) nei ruminati è una APPs maggiore e presenta valori pressoché nulli nei soggetti sani, per aumentare di oltre 100 volte dopo un insulto. Nel cane, la Hp è una APP moderata ed è normalmente presente in circolo nei soggetti sani (Conner et al., 1988a; Conner et al., 1988b; Eckersall et al., 1996). Nel gatto sono state evidenziate alte concentrazioni di Seroamiloide-A (SAA) in seguito ad uno stimolo infiammatorio e chirurgico; un aumento della Hp e della α -glicoproteina acida (AGP) si ha, invece, in un secondo

momento, tuttavia, la concentrazione della CRP non subisce variazioni significative durante la APR in questa specie (Kajikawa et al., 1999).

1.3.4 INFLUENZA DI RAZZA E SESSO

In cani sani di razza Beagle le concentrazioni di AGP sono risultate significativamente più basse rispetto a quelle di cani meticci (Yuki et al, 2010), inoltre, in seguito all'inoculazione di *Ehrlichia canis*, i Beagle hanno mostrato picchi di aumento di concentrazioni di CRP nettamente superiori a quelli descritti nei meticci-pastori tedeschi (Shimada et al, 2002). Nei Greyhound le concentrazioni di Hp e AGP risultano più basse rispetto ai cani non-Greyhound (Couto et al, 2009). Non è mai stata evidenziata alcuna differenza per quanto concerne il sesso nel cane (Kuribayashi et al, 2003).

1.3.5 INFLUENZA DELL'ETÀ

Non sono numerosi gli studi in letteratura riguardo l'influenza dell'età sulle proteine di fase acuta. Uno studio sperimentale di alcuni autori giapponesi dimostra che le concentrazioni di CRP in seguito alla somministrazione di olio turpentine aumentano in misura significativamente minore nei cani di 1 mese di età rispetto a quelli di 3 e 18 mesi, tra i 3 e i 72 mesi d'età sembra non si verifichi, invece, alcun cambiamento significativo (Kuribayashi et al, 2003); pertanto, nel caso in cui si voglia monitorare una risposta infiammatoria in un cucciolo, occorre tenere conto dell'età del paziente (Hayashi et al, 2001). I cuccioli di età inferiore ai 3 mesi hanno concentrazioni di AGP più basse del 70% rispetto agli adulti, per poi raggiungere gradualmente le concentrazioni da adulto intorno ai 7 mesi d'età (Yuki et al, 2010).

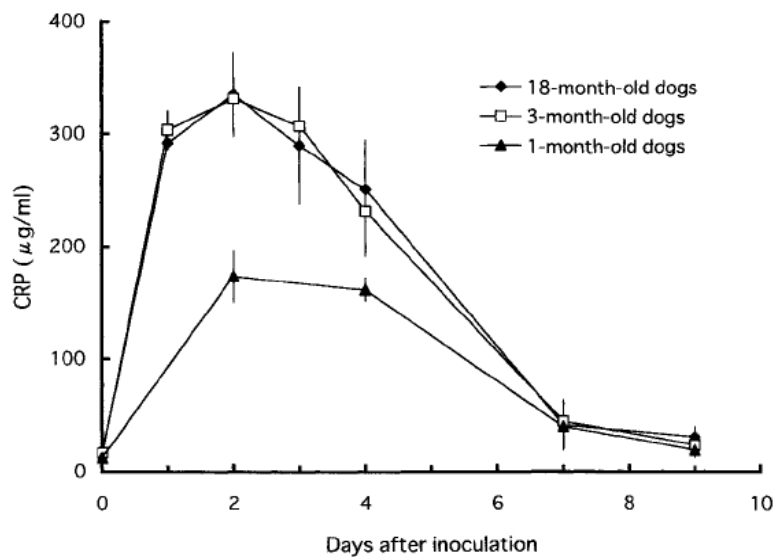


Figura 1.2: concentrazioni di CRP dopo la somministrazione di olio turpentine in cani di 1 mese, 3 mesi e 18 mesi (Modificato da: Hayashi et al, 2001).

1.3.6 INFLUENZA DELL'OBESITÀ

Nell'uomo l'obesità è considerata una condizione infiammatoria in quanto determina un aumento della produzione ed il rilascio di mediatori proinfiammatori (Das, 2001) i quali sono accompagnati anche da un aumento dei globuli bianchi (Womack et al, 2007); nei soggetti obesi, inoltre, è possibile riscontrare un aumento di CRP (Veiga et al, 2008) e l'insulina riduce i livelli di CRP (Dandona et al, 2007). Nella medicina canina, tali meccanismi non sono ancora ben chiari, l'espressione genica della CRP e della Hp è stata identificata nel tessuto adiposo canino e tali APPs possono essere sintetizzate dagli adipociti stessi (Eisele et al, 2005). Secondo alcuni Autori, i cani obesi, contrariamente all'uomo, hanno concentrazioni di CRP inferiori ($0.76 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$, intervallo 0.5–1.9) rispetto ai cani non obesi ($2.72 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$, intervallo 0.6–8.8) (Veiga et al, 2008). Alcuni Autori inglesi, comparando le concentrazioni di CRP in cani obesi prima e dopo perdita di peso, hanno evidenziato, invece, una concentrazione ematica di CRP pre-dieta di 0,2-18,0 mg/L (Media 2,8) con il 35% dei casi con

concentrazione superiore al range di riferimento. Dopo il trattamento dietetico le concentrazioni di CRP sono risultate essere di 0,1-2,0 mg/L (media 1,4 mg/L) con un 15% di soggetti con valori superiori al range di riferimento. Anche le concentrazioni di Hp diminuiscono progressivamente con la perdita di peso pur rimanendo sempre nell'intervallo di riferimento. Le concentrazioni di TNF- α risultano più elevate nei soggetti obesi (Gayet et al, 2004) e diminuiscono con la perdita di peso (German et al, 2009). Apparentemente le concentrazioni di SAA non hanno dimostrato alcuna differenza pre e post-dieta (German et al, 2009). L'obesità quindi potrebbe essere associata ad uno stato infiammatorio subclinico che si risolve quando si ripristina il normale stato di nutrizione (German et al, 2009).

1.3.7 INFLUENZA DELLO STRESS

È ben nota l'influenza dello stress sulla temperatura corporea nei nostri animali, tuttavia, l'effetto che esso possa avere sulla concentrazione delle APPs rimane ancora controverso in quanto risulta difficile distinguere l'effetto dello stress da quello del trauma o di infezioni subcliniche (Petersen et al, 2004). Alcuni autori, in passato, hanno evidenziato che nella specie suina la somministrazione di ACTH o di prednisone può scatenare un aumento di CRP (Bürger et al, 1998) e che uno stress acuto non provoca alcuna influenza sulle concentrazioni di Hp (Hicks et al, 1998); studi più recenti dimostrano che nel cane la somministrazione di corticosteroidi esogeni o l'ipercortisolismo spontaneo comportano un aumento ematico di Hp, avanzando l'ipotesi che possano portare ad una diminuzione della CRP. Secondo alcuni Autori, uno stress può portare all'attivazione oltre che di meccanismi comportamentali e neuroendocrini, anche della risposta di fase acuta (Siracusa et al, 2008)

1.3.8 INFLUENZA DELLA GRAVIDANZA

Elevate concentrazioni di CRP sono state rilevate anche in cagne durante la gestazione (Eckersall et al, 2003; Vanucchi, 2002). Sembra, infatti, che il danno endometriale indotto dall'impianto dell'embrione scateni una risposta di fase acuta nell'organismo materno. Le concentrazioni di CRP infatti aumentano progressivamente durante la gestazione raggiungendo il picco massimo 30-45 giorni dopo l'ovulazione (Kuribayashi et al, 2003)

1.4 ELETTROFORESI SIERICA

Prima dell'avvento delle specifiche tecniche per la misurazione delle singole proteine di fase acuta, il monitoraggio del rapporto albumine:globuline era lo standard in Medicina Umana e Veterinaria per la valutazione dei processi infiammatori. La tecnologia si è progressivamente evoluta dall'elettroforesi a metodiche quantitative specie specifiche che permettono un più dettagliato profilo delle proteine di fase acuta. È utile ricordare che in un tracciato elettroforetico delle proteine sieriche la maggior parte delle APPs migra nell'area delle α e β globuline. Infatti, può essere sfruttata una semplice elettroforesi sierica per identificare un aumento delle concentrazioni delle APPs, tuttavia questo metodo risulta meno sensibile della valutazione individuale delle diverse APPs (Martínez-Subiela et al., 2002).

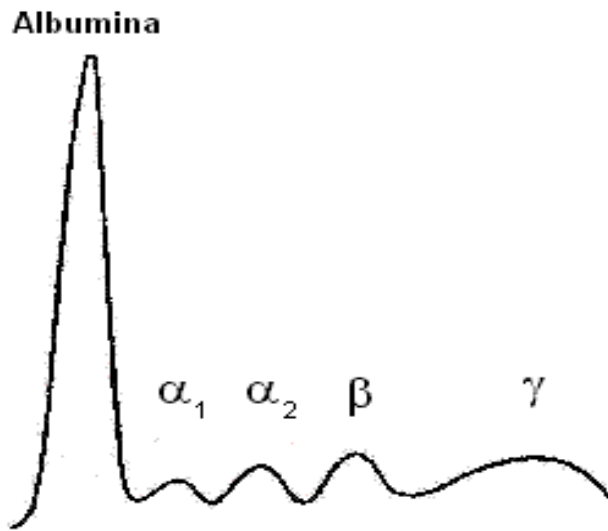


Figura 1.3: esempio di tracciato elettroforetico normale.

| Tracciato | | APPs che migrano |
|-----------|------------|--|
| Albumine | | Albumine |
| Globuline | α_1 | AGP |
| | α_2 | SAA, Hp |
| | β | CRP, Fb, Transferrina, IgM, IgG (parzialmente) |
| | γ | IgG |

Tabella 1.3: APPs che migrano nel tracciato elettroforetico (Caspi et al, 1984; Abate et al, 2000; Cerón et al, 2005).

CAPITOLO 2

Caratteristiche delle APPs

2.1 INTRODUZIONE

Le APPs descritte in Medicina Umana sono numerose ed ognuna di esse possiede proprietà molecolari e funzioni biologiche caratteristiche. Per poter studiare la loro potenziale applicazione clinica negli animali da compagnia, è importante conoscere il loro comportamento biologico, le loro funzioni nell'organismo e quali fattori possono falsarne il risultato laboratoristico; occorre tenere presente, inoltre, che ogni specie animale ha un “pattern” di APPs differente (Heinrich et al, 1990) e che non tutte le APPs rispondono allo stesso modo nelle diverse specie (Eckersall et al, 1999)

2.2 PROTEINE DI FASE ACUTA POSITIVE

Le proteine di fase acuta positive sono così definite in quanto la loro concentrazione aumenta durante la risposta di fase acuta e, come già descritto nel capitolo precedente, ogni proteina positiva ha una sua magnitudo e cinetica che la caratterizza. Le APPs positive maggiormente studiate in Medicina Veterinaria sono la CRP, la SAA, l'AGP, l'Hp e il Fibrinogeno (Figura 2.1).

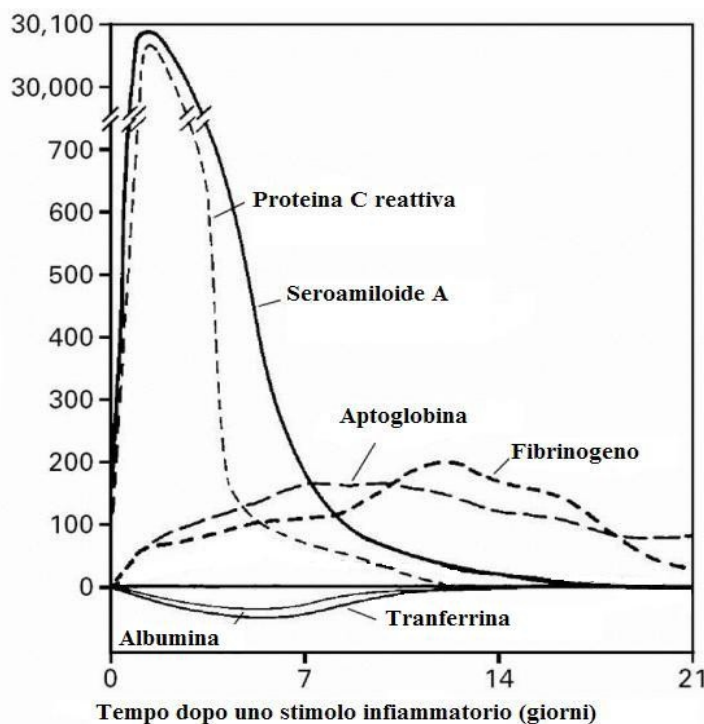


Figura 2.1: cinetica della produzione di APP dopo un moderato stimolo infiammatorio (Modificato da: Gabay, 2006).

2.2.1 PROTEINA C-REATTIVA (CRP)

Scoperta nel 1930 da Tillet e Francis, la CRP è attualmente la proteina di fase acuta di maggior interesse in Medicina Umana, in quanto principale marker di infezioni, patologie autoimmuni, traumi, malignità dei tumori, necrosi ed infarto miocardico; per tali motivi la CRP ha attirato anche l'attenzione della Medicina Veterinaria e qualche decennio più tardi è stata identificata (Dillman e Coles, 1966), isolata (Riley e Coleman, 1970; Caspi et al, 1984) e caratterizzata (Caspi et al, 1984) anche nel cane. La CRP è dotata di elevata sensibilità nel rilevare uno stato infiammatorio, tuttavia risulta poco specifica; numerose patologie, infatti, possono dare un aumento di tale marker (Chan et al, 2009). La CRP si è rivelata negli anni un utile marker per il monitoraggio e la risposta alla terapia di numerose patologie, così come nello screening del benessere animale (Kao et al, 2006).

2.2.1.1 Caratteristiche della molecola

La CRP appartiene alla famiglia delle pentraxine ed è stata inizialmente nominata così per la sua capacità di legare e precipitare il polisaccaride-C dello *Streptococcus Pneumoniae* (Tillet e Francis, 1930). Ha un peso molecolare di 115 kDa ed è costituita da 5 subunità di 20 kDa ciascuna, (Pepys e Baltz, 1983; Eckersal e Conner, 1988) associate con un legame non covalente, due delle quali sono glicosilate (Caspi et al, 1984).

2.2.1.2 Funzione biologica

La CRP è la maggiore APP nei primati, maiali, conigli, criceti e cani e può agire come un'opsonina legandosi ai residui e ai polisaccaridi sui batteri, funghi e parassiti per attivare il complemento e promuovere la fagocitosi; è stata definita come una primitiva forma di anticorpo atta ad interagire in modo aspecifico con i componenti delle membrane cellulari dei microrganismi (Cerón et al, 2005). Oltre alla fagocitosi batterica, possiede altre importanti funzioni biologiche:

- induzione di altre citochine
- inibizione della chemiotassi
- modulazione della funzione dei neutrofili
- possiede alta affinità per la cromatina del nucleo delle cellule danneggiate, pertanto può degradarne i componenti nucleari per facilitarne l'eliminazione (Robey et al, 1985; Mansfield et al, 2008; Cray et al, 2009).

2.2.1.3 Cinetica e Magnitudo

La CRP è una APP maggiore nell'uomo e nel cane (Tabella 2.1), infatti, durante la APR, la concentrazione ematica della CRP inizia ad aumentare dopo 4 ore dall'insulto (Caspi et al, 1984) raggiungendo concentrazioni di 100 fino a 1000 volte il valore basale in circa 24-48 ore. I livelli sierici di CRP riflettono strettamente l'estensione del danno tissutale (Caspi et al, 1984).

| SPECIE | CINETICA e MAGNITUDO |
|--------|---|
| Cane | APP maggiore |
| Gatto | Non aumenta in corso di APR (Kajikawa et al, 1999) |
| Bovino | Non è considerata una APPs (Nakajima et al, 1993) |
| Uomo | APP maggiore |

Tabella 2.1: differenze di specie per quanto concerne la cinetica della CRP.

2.2.1.4 Metodiche di laboratorio

La misurazione della CRP sierica si effettua generalmente mediante dosaggio immunologico, utilizzando anticorpi specifici per la CRP canina. Nel corso degli anni sono stati descritti altri metodi di misurazione come ad esempio metodiche immunoturbidimetriche su analizzatore biochimico automatizzato (Eckersall et al, 1991), metodiche ELISA (Rikihisa et al, 1994; Kjelgaard-Hansen et al, 2003b), test di agglutinazione su vetrino (Tagata et al, 1996), dosaggio immunoturbidimetrico ad uso umano (Kjelgaard-Hansen et al, 2003a) o nuovi metodi basati sulla immunofluorimetria time-resolved (TR-IFMA) (Parra et al, 2006).

2.2.1.5 Fattori che ne influenzano la misurazione

Stoccaggio: nonostante non siano numerosi gli studi in merito, la CRP canina come analita appare relativamente stabile a -10°C per almeno 3 mesi (Riley e Zontine, 1972).

Anticoagulanti: i valori di CRP risultano significativamente inferiori se misurati su plasma citrato piuttosto che su siero (Martínez-Subiela e Cerón, 2005).

Emolisi, lipemia e bilirubinemia: se si utilizza una metodica “commerical solid phase sandwich immunoassay” la CRP subisce modificazioni significative nei campioni emolitici, con iperbilirubinemia o lipemici (Tabella 2.2) (Martínez-Subiela e Cerón, 2005). L'utilizzo, invece, di nuove metodiche “time-resolved immunofluorometric assays (TR-IFMAs)” permette di valutare corrette concentrazioni di CRP anche in campioni con emolisi, con iperbilirubinemia o ipertrigliceridemia (Parra e Cerón, 2007).

| APPs | Metodica | Emolisi | Lipemia | Bilirubinemia |
|------|----------------------|--|-----------------------------------|----------------|
| CRP | ELISA | Aumenta* | Aumenta* | Diminuisce* |
| | Immunoturbidimetrico | Diminuisce del 90% quando Hb=80 mg/dl | - | - |
| Hp | Spettrofotometrico | Diminuisce del 25-30% quando Hb=0,3-10 mg/ml | Nessun effetto | Nessun effetto |
| | Immunoturbidimetrico | Diminuisce del 70-80% quando Hb>25 mg/dl | Aumenta se trigliceridi>100 mg/dl | - |
| SAA | ELISA | Nessun effetto | Nessun effetto | Nessun effetto |
| Cp | Spettrofotometrico | Aumenta quando Hb<2,5 mg/dl; diminuisce quando Hb>2,5 mg/dl* | Aumenta* | Aumenta* |

Tabella 2.2: interferenze di alcune sostanze su alcune metodiche di misurazione delle APPs. Hb= Emoglobina; *Nessun impatto significativo sull'interpretazione clinica dei dati (Modificato da: Cerón et al, 2005).

Nonostante sia stato dimostrato che l'emolisi, la lipemia e l'iperbilirubinemia causano differenze statisticamente significative nei risultati ottenuti, la magnitudine di tali differenze è relativamente piccola e difficilmente può risultare clinicamente rilevante (Martínez-Subiela e Cerón, 2005). Solo la diminuzione di CRP in corso di emolisi misurata con metodiche immunoturbidimetriche può avere un impatto sull'interpretazione clinica (Cerón et al, 2005).

2.2.1.6 CRP su altri substrati

Nell'ultimo decennio, sia in Medicina Umana che Veterinaria, sono state valutate le concentrazioni di CRP su altri substrati rispetto al sangue. Queste nuove applicazioni hanno permesso di ampliare le possibilità nel campo del controllo delle derrate alimentari come ad esempio il latte vaccino e la carne suina e di permettere la misurazione della CRP su substrati che possano fornire indicazioni cliniche maggiori come ad esempio le effusioni o le urine.

- CRP nella Saliva

Le concentrazioni di CRP misurate tramite metodica immunofluorimetrica time-resolved su saliva di cani sani e di soggetti con un processo infiammatorio in atto hanno mostrato una forte correlazione con le concentrazioni ematiche della stessa (Parra et al, 2005); pertanto la misurazione di tale APP sulla saliva può essere utilizzata come valida alternativa nei casi in cui non sia possibile prelevare un campione ematico; il prelievo di saliva, infatti, richiede una tecnica meno stressante per il paziente e può essere effettuato in condizioni di campo (Parra et al, 2005).

- CRP nelle effusioni

La concentrazione di CRP può essere valutata attraverso una metodica immunofluorimetrica time-resolved anche nei versamenti di differente natura e può essere un utile marker per il clinico per differenziare un trasudato da un trasudato modificato o da un essudato (Parra et al, 2006). Le concentrazioni di CRP nel trasudato, nel trasudato modificato e nell'essudato sono infatti via via crescenti con una differenza statisticamente significativa (Parra et al, 2006). Una concentrazione di CRP <4 µg/ml ha una sensibilità del 100% e una specificità del 94,4% nel differenziare un trasudato da un essudato e una concentrazione <11 µg/ml ha una sensibilità dell'88,2% e una specificità del 100% nel differenziare un trasudato modificato da un essudato (Parra et al, 2006). Nelle effusioni con concentrazioni proteiche o conta cellulare dubbie, la misurazione della CRP può essere un valido supporto per il clinico nel differenziare il tipo di versamento del paziente (Parra et al, 2006).

- CRP nelle urine

Recentemente la CRP è stata misurata anche nelle urine ed utilizzata come potenziale marker di danno renale (Maddens et al, 2008; Smets et al, 2010), tuttavia la concentrazione di CRP urinaria (uCRP) non è risultata statisticamente differente tra i soggetti sani e quelli con danno renale (cronic kidney disease o CKD) (Smets et al, 2010). Occorre sottolineare che nei cani sani le concentrazioni di uCRP sono nulle, in 3 soggetti su 10 affetti da CKD è stato possibile, invece, rilevare un aumento di uCRP (Smets et al, 2010). La concentrazione di uCRP, in quanto proteina ad alto peso molecolare, risulta un marker promettente nella stadiazione della CKD, tuttavia occorrono ulteriori studi per confermare tale reperto (Smets et al, 2010).

2.2.2 APTOGLOBINA (Hp)

Descritta per la prima volta nel 1939 per la sua abilità di aumentare la stabilità dell'attività della perossidasi dell'emoglobina a pH basso (Polonovski et al, 1939), l'Aptoglobina (Hp) è un'altra proteina di fase acuta che ha catturato l'interesse della Medicina Veterinaria. Possiede caratteristiche peculiari che possono renderla utile nel protocollo diagnostico e nel monitoraggio terapeutico di numerose patologie.

2.2.2.1 Caratteristiche della molecola

La Hp canina è una α_2 -globulina con un peso molecolare approssimativamente di 81 kDa, ha una struttura a 2 catene $\alpha\beta$, legate tra loro da un legame non covalente (Petersen et al, 2004). Nell'uomo l'identificazione di 16 differenti sottotipi ha reso l'Hp un utile marker genetico (Petersen et al, 2004). La Hp canina è strutturalmente simile a quella Umana Hp 1-1, rispettando il contenuto aminoacidico ed il peso molecolare di 81 kDa, tuttavia differisce per il fatto che la catena α della molecola canina ha una sequenza oligosaccaridica legante ed è glicosilata. Il pattern di glicosilazione della Hp è differente nei vari tipi di patologie e tale aspetto potrebbe in futuro rivelarsi utile per differenziare i diversi processi patologici (Ebersole e Cappelli, 2000).

2.2.2.2 Funzioni biologiche

Sono state descritte diverse funzioni biologiche dell'Hp, tuttavia la principale è indubbiamente quella di legare le molecole di ferro formando dei complessi stabili con l'emoglobina libera (Hb), rendendo il ferro inutilizzabile da parte dei batteri, quindi inibendo la proliferazione batterica. Il complesso Hp-Hb è veicolato al fegato attraverso il sistema reticolo-endoteliale e metabolizzato dalle cellule del Kuppfer (Putnam, 1975).

La Hp riduce anche la disponibilità di ferro per la produzione dei globuli rossi, ne consegue che in corso di infezione cronica si riscontra frequentemente anemia. È possibile identificare gli animali con gravi infezioni o infiammazioni misurando l'Hp. Altre funzioni biologiche della Hp sono:

- effetti batteriostatici
- stimolazione dell'angiogenesi
- effetti immunomodulatori (Petersen et al, 2004)

2.2.2.3 Cinetica e Magnitudo

La Hp è una APP maggiore nei ruminanti, cavallo e gatto; è moderata, invece, nel cane (Tabella 2.3), la sua concentrazione, infatti, aumenta gradualmente di 2-3 volte il suo valore basale (Eckersall, 1995) fino a raggiungere il picco a circa 5 giorni dopo l'insulto, per poi diminuire altrettanto gradualmente (Conner et al, 1988a).

| SPECIE | CINETICA e MAGNITUDO |
|---------|---|
| Cane | APP moderata |
| Gatto | APP maggiore |
| Bovino | APPs maggiore. Assente nel siero in condizioni di normalità. |
| Cavallo | APPs maggiore |

Tabella 2.3: cinetica della Hp nelle differenti specie.

2.2.2.4 Metodiche di laboratorio

Le tecniche di laboratorio per misurare la Hp sono essenzialmente di due tipi: metodiche spettrofotometriche, alcune delle quali sono basate sull'abilità della Hp di legare l'emoglobina formando un complesso Hp-Hb che o altera l'assorbanza caratteristica della Hb in proporzione alla concentrazione di Hp del campione oppure preserva l'attività della perossidasi ad uno specifico pH acido, la quale poi può essere rilevata e quantificata (Cerón et al, 2005). È stata descritta e validata anche una metodica multispecie automatica spettrofotometrica basata sull'attività della perossidasi del complesso Hp-Hb, nel quale viene eliminata l'interferenza delle albumine sieriche.

Metodiche immunologiche: per l'uso nella specie canina sono state validate tecniche nefelometriche, con le quali viene misurato il grado di precipitazione del complesso antigene-anticorpo. Questa metodica dipende dalla cross-reattività tra l'antisiero ricavato dalla Hp umana e la Hp canina, pertanto deve essere validato correttamente prima dell'uso (Cerón et al, 2005).

2.2.2.5 Fattori che ne influenzano la misurazione

Stoccaggio: la Hp è più stabile su siero che non in preparazioni purificate (Parra et al, 2004), tuttavia è stata descritta una diminuzione delle concentrazioni di Hp su siero canino stoccato a -20°C ed è stata proposta una temperatura di -70°C per stoccaggi prolungati (Weidmeyer e Solter, 1996).

Anticoagulanti: i valori di Hp risultano significativamente maggiori quando si utilizza l'eparina come anticoagulante, tuttavia gli effetti degli anticoagulanti sulle concentrazioni delle APPs non hanno un'influenza rilevante sulla interpretazione clinica del dato (Martínez-Subiela e Cerón, 2005).

Emolisi, lipemia e bilirubinemia: la presenza di emoglobina libera nel campione di sangue riduce drammaticamente la concentrazione misurata di Hp (Eckersall et al, 1999; Petersen et al, 2001). La diminuzione delle concentrazioni di Hp in corso di emolisi sia in vivo che in vitro risulta imponente e può avere un impatto significativo sulla interpretazione clinica del risultato (Cerón et al, 2005) (Tabella 2.2).

2.2.3 α -1 GLICOPROTEINA ACIDA (AGP)

L' α -1 glicoproteina acida (AGP), anche conosciuta come orosomucoide, è una glicoproteina rilevata nella regione α -1 dell'elettroforetogramma proteico ed è principalmente sintetizzata e metabolizzata dal fegato. Si suppone sia coinvolta nei meccanismi di difesa dell'organismo.

2.2.3.1 Caratteristiche della molecola

L'AGP ha un peso molecolare di 43 kDa e la sua principale caratteristica biochimica è quella di essere una proteina altamente glicosilata; è la principale componente del seromucoide, la frazione del plasma che è maggiormente resistente alla precipitazione acida (Eckersall, 2000). L'AGP canina è stata purificata e caratterizzata e, analogamente a quella umana, è stata descritta come una proteina particolare con un pH molto basso di 2.8-3.8 e un alto contenuto di carboidrati di circa il 40-45% (Cerón et al, 2005; Yuki et al, 2010).

2.2.3.2 Funzione biologica

L'AGP possiede attività antiinfiammatoria e immunomodulatoria, sopprime le funzioni immunitarie quali la fagocitosi neutrofilica e la blastogenesi linfocitica modulando gli effetti dell'IL-1, IL-6 e TNF (Baumann e Gauldie, 1994). Altre sue importanti funzioni sono quelle di giocare un ruolo fondamentale nella riparazione del danno tissutale causato dall'infiammazione (Fournier et al, 2000) e di legare numerosi farmaci come ad esempio il fenobarbitale.

2.2.3.3 Cinetica e Magnitudo

L'AGP è una APP positiva maggiore nel gatto, è moderata, invece, nel cane (Ceróet al, 2005). Le sue concentrazioni aumentano di 2-5 volte i valori basali in corso di risposta di fase acuta nel cane e raggiungono il picco di concentrazione circa 7 giorni dopo l'insulto.

2.2.3.4 Metodiche di laboratorio

Solitamente l'AGP viene misurata attraverso un'immunodiffusione radiale su gel di agarosio impregnato con siero di coniglio ricco di anticorpi anti-AGP. Questi test sono specie-specifici e attualmente sono disponibili in commercio per cane e gatto, tuttavia hanno lo svantaggio di richiedere 24-48 ore per il completamento della diffusione (Eckersall et al, 1999). Per tale motivo sono stati sviluppati metodi immunoturbidimetrici per la misurazione dell'AGP canina e felina (Kuribayashi et al, 2003b Bence et al, 2005), i quali offrono il vantaggio di essere più rapidi ed adattabili all'analizzatore automatico (Cerón et al, 2005).

2.2.4 SEROAMILOIDE-A (SAA)

2.2.4.1 Caratteristiche della molecola

La seroamiloide-A (SAA) è una piccola proteina sierica con un peso molecolare di 15 kDa. Si suppone sia il precursore della proteina A dell'amiloide, la principale proteina dell' α -amiloide. Sarebbe, quindi, potenzialmente coinvolta nella patogenesi dell'amiloidosi e di altri processi cronici come l'artrite reumatoide (Uhlar e Whitehead, 1999).

2.2.4.2 Funzione biologica

La SAA è immunosoppressiva e sembra possa regolare la risposta immunitaria, è un “chemoattraente” per neutrofili, monociti e cellule T, modula il processo infiammatorio inibendo il rilascio di mieloperossidasi e la proliferazione dei linfociti. La SAA è inoltre coinvolta nel metabolismo e nel trasporto lipidico (Uhlar e Whitehead, 1999).

2.2.4.3 Cinetica e Magnitudo

La SAA è la maggior APP nella pecora, gatto e cavallo ed è importante anche nell'uomo e nel cane. In Medicina Umana questa proteina mostra una sensibilità, una velocità di risposta e una dinamicità di variazione comparabili con quelli della CRP (Pepys e Balz, 1983). La SAA canina è una APP maggiore, pertanto può aumentare di centinaia di volte durante la risposta di fase acuta, richiede tuttavia qualche giorno per raggiungere il picco massimo di concentrazione (Cerón et al, 2005).

2.2.4.4 Metodiche di laboratorio

Fino a qualche anno fa l'utilizzo della SAA in Medicina Veterinaria è stato limitato dalle difficoltà di purificazione e quantificazione della proteina (Horadagoda et al, 1999), tuttavia l'ultimo decennio ha visto lo sviluppo di numerose metodiche per la misurazione di tale proteina nella specie felina e canina come ad esempio ELISA-Sandwich con anticorpi anti-SAA felina e canina (Yamamoto et al, 1994a; Sasaki et al, 2003). Esiste in commercio anche un test ELISA per la determinazione della SAA nelle specie di interesse veterinario, ma che si avvale di un antisiero monoclonale diretto contro la SAA umana, tale test è risultato utile nel campo della medicina sia canina (Martínez-Subiela e Cerón, 2005) che felina (Giordano et al, 2004). Sono stati proposti anche metodi immunoturbidimetrici (Hansen et al, 2006).

2.2.5 FIBRINOGENO

In Medicina Umana, l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di Fibrinogeno rappresenta un marker di aterosclerosi subclinica ed è utile nell'identificare i soggetti con maggior rischio di sviluppare patologie cardiovascolari (Paramo et al, 2005). Nel cane, il fibrinogeno è stato proposto come indicatore non specifico di infiammazione, tuttavia non possiede una sensibilità e una specificità particolarmente elevate.

2.2.5.1 Caratteristiche della molecola

Il Fibrinogeno (Fb) è una β -globulina presente nel plasma di tutti i vertebrati, composta da tre catene polipeptidiche unite tra loro da ponti disulfidrilici. Contiene il 3-5% di carboidrati ed è sintetizzata dal fegato e dal tessuto endoteliale (Cerón et al, 2005).

2.2.5.2 Funzione biologica

Il Fb svolge un ruolo essenziale nel processo coagulativo, viene infatti trasformato dalla trombina, tramite un processo di polimerizzazione, in fibrina necessaria alla formazione del trombo emostatico.

2.2.5.3 Cinetica e Magnitudo

Le concentrazioni di Fb sono fortemente influenzate da numerose condizioni patologiche, una diminuzione delle concentrazioni ematiche di Fb sono attribuibili ad una sua sintesi insufficiente, come ad esempio in corso di patologie epatiche, oppure ad un consumo eccessivo, per esempio in corso di una coagulazione intravascolare disseminata. Tuttavia, il Fb è anche una APP positiva moderata, pertanto le sue concentrazioni ematiche subiscono un aumento in seguito ad un insulto di tipo infiammatorio, continuando ad aumentare per diversi giorni. Le sue concentrazioni basali aumentano di circa 3-4 volte in seguito all'insulto, per poi rientrare ai livelli basali dopo circa 8 giorni (Conner et al, 1988b).

2.2.5.4 Metodiche di laboratorio

Le metodiche utilizzate per la misurazione del Fibrinogeno si basano sulla sua attività biologica, cioè sul grado di formazione di fibrina insolubile in presenza di eccesso di trombina oppure sulla sua precipitazione in seguito ad un trattamento con calore (Gentry, 1999).

2.2.6 CERULOPLASMINA

2.2.6.1 Caratteristiche della molecola

La Ceruloplasmina (Cp) nel cane è una APP positiva ed è una α_2 -glicoproteina (Cerón et al, 2005). Studi effettuati sulla Cp Umana, hanno mostrato che si tratta di una proteina con un peso molecolare di 151 kDa e che contiene 0,34% di Rame, il quale corrisponde a 8 atomi di rame per ogni molecola.

2.2.6.2 Funzione biologica

Le funzioni biologiche della Cp sono le seguenti:

- trasporta il rame necessario per la guarigione della lesione, la formazione del collagene e la sua maturazione;
- protegge le cellule e i tessuti dai composti ossidanti generati dai fagociti in corso di eliminazione di microrganismi o detriti tissutali;
- riduce il numero dei neutrofilo adesi all'endotelio (Samokyszyn et al, 1989).

2.2.5.3 Cinetica e Magnitudo

La concentrazione ematica di Cp nel cane aumenta maggiormente e più rapidamente che non nell'uomo, raggiungendo il picco di due volte la concentrazione basale dopo circa 5 giorni (Conner et al, 1988a).

2.2.5.4 Metodiche di laboratorio

Per la misurazione della Cp in Medicina Veterinaria si utilizzano prevalentemente metodiche basate sull'ossidazione di diverse componenti come la *p*-fenilenediamina (PPD) o il suo N-dimetil-derivato. Metodi manuali (Conner et al, 1988a; Solter et al, 1991) ed automatizzati (Cerón e Martínez-Subiela, 2004) basati sulla attività della PPD-ossidasi hanno, infatti, trovato ampio utilizzo nella determinazione della Cp canina. Uno dei principali problemi per la sua misurazione è l'assenza in commercio di materiali di riferimento per la standardizzazione delle concentrazioni di tale proteina e l'utilizzo di arbitrarie unità di misura basate sull'aumento di assorbanza per unità di tempo ed espresse in unità ossidasi (Conner et al, 1988a) o UI/L (Solter et al, 1991)

2.3 PROTEINE DI FASE ACUTA NEGATIVE

Alcune proteine, durante la risposta di fase acuta, diminuiscono di concentrazione, per tale motivo vengono chiamate APPs negative. Le più studiate nel cane sono l' Albumina e la Tansferrina.

2.3.1 ALBUMINA

L'albumina è la proteina maggiormente rappresentata nel sangue, costituisce il 35-50% di tutte le proteine del plasma di cani e gatti sani ed è, pertanto, la banda maggiormente rappresentata nell'elettroforetogramma delle sieroproteine. Le albumine sono responsabili del 75% della pressione osmotica del plasma e rappresentano la maggior risorsa amminoacidica dell'organismo animale (Cerón et al, 2005).

Nella pratica routinaria, tali proteine vengono generalmente misurate attraverso metodiche spettrofotometriche con test colorimetrici come ad esempio il test con verde

di bromocresolo. Quando il verde reagisce con l'albumina, si forma un complesso colorato, la cui assorbanza può essere misurata ed è proporzionale alla concentrazione di albumina del campione (Cerón et al, 2005). L'albumina è una APPs negativa, pertanto le sue concentrazioni ematiche diminuiscono in corso di risposta di fase acuta, tuttavia è fortemente influenzata da numerosi processi fisiopatologici, subendo importanti modificazioni che ne impediscono l'utilizzo come marker infiammatorio.

2.3.2 TRANSFERRINA

La transferrina è una glicoproteina plasmatica costituita da un'unica catena polipeptidica di circa 700 amminoacidi, è responsabile del trasporto del ferro in circolo, infatti a pH neutro lo lega come ferro ionico in due siti. Nonostante possa essere misurata con metodiche immunologiche, la transferrina comunemente viene determinata valutando la capacità totale del siero di legare il ferro (Total Iron Binding Capacity o TIBC). Questo test si effettua aggiungendo ferro esogeno al campione e determinando la quantità di ferro che si lega alla transferrina (Cerón et al, 2005).

CAPITOLO 3

Applicazione clinica delle APPs

3.1 INTRODUZIONE

Le proteine di fase acuta (Acute Phase Proteins o APPs) sono bene note in Medicina Umana per le loro numerose applicazioni cliniche. La risposta di fase acuta è precoce e rapida, si scatena prima del sistema immunitario specifico e, in molti casi, prima della manifestazione dei segni clinici; questi aspetti rendono le APPs dei promettenti marker diagnostici e prognostici in numerose condizioni quali, ad esempio, le patologie cardiovascolari, quelle autoimmuni, nel trapianto d'organo e nel trattamento delle neoplasie (Cray et al, 2009). Per quanto concerne la Medicina Veterinaria, nonostante tali proteine siano studiate fin da metà del XX secolo, la loro applicazione clinica non è descritta fino ai primi anni del 1990. Ad oggi, in letteratura, sono presenti numerose “review” che descrivono tali proteine e la risposta di fase acuta negli animali da compagnia (Murata et al, 2004; Petersen et al, 2004; Cerón et al, 2005; Cray et al, 2009). Al pari della Medicina Umana, quella Veterinaria ha descritto tali proteine essere sensibili agli stessi eventi scatenanti. Negli animali da reddito le APPs sono state proposte come marker di benessere dell'allevamento (Murata et al, 2004; Petersen et al, 2004; Ganheim et al, 2007), negli animali da compagnia, invece, sono prevalentemente descritte come marker prognostici (Cray et al, 2009). In Medicina Veterinaria l'utilizzo delle APPs, in particolare quello della CRP, ha inoltre trovato un'importante applicazione nella medicina sperimentale (Hanton et al, 2008; Tsuchiya et al, 2009).

3.2 APPs nei PROCESSI NEOPLASTICI

Le APPs nella medicina canina e felina hanno trovato applicazione nei protocolli diagnostici e di monitoraggio terapeutico di alcune patologie su base neoplastica. Ad esempio, nel cane le concentrazioni di AGP sono significativamente elevate in corso di carcinomi, sarcomi e linfomi rispetto ai cani sani (Yuki et al, 2011), la CRP, la SAA e l'Hp sono risultate aumentate in soggetti con neoplasie mammarie e/o ematopoietiche (Tecles et al, 2009), tuttavia non è ancora chiaro l'andamento delle APPs in altri tipi di tumori (Yuki et al, 2011).

3.2.1 NEOPLASIE EMATOPOIETICHE

Gli studi degli ultimi anni riguardo l'utilizzo prognostico delle APPs in corso di neoplasie ematopoietiche in Medicina Umana hanno mostrato dati interessanti. Le concentrazioni ematiche di CRP e AGP sono fortemente correlate allo stadio e alla presenza dei segni clinici nel linfoma Non-Hodgkin (Pedersen e Sørensen, 2003), nel linfoma Hodgkin (Wieland et al, 2003) e nella leucemia mieloide cronica (Le Coutre et al, 2002). Nel mieloma multiplo le concentrazioni di CRP, AGP e α -1-antitripsina sono inversamente correlate alla sopravvivenza del paziente pertanto risultano utili come marker prognostici (Alexandrakis et al, 2003). Le APPs possono essere utilizzate nei processi neoplastici anche per monitorare il decorso clinico, l'efficacia della terapia e nel monitoraggio delle recidive. Questo è stato dimostrato per la Ceruloplasmina in corso di leucemia mieloide acuta (Kovtunova et al, 2003) e per l'AGP e la CRP in corso di leucemia mieloide cronica, dove l'aumento dei livelli di AGP compare prima dei cambiamenti ematologici (Le Coutre et al, 2002), inoltre la CRP è stata utilizzata come indicatore di sepsi durante i periodi di leucopenia dovuta alla chemioterapia (Bayer et al, 2000). Le APPs sono state studiate anche in Medicina Veterinaria, sia nella specie

felina che quella canina. Tali studi hanno messo in evidenza significativi e cospicui aumenti delle concentrazioni di CRP e Hp nei cani affetti da neoplasie linfatiche e concentrazioni di Hp significativamente maggiori nella leucemia linfoblastica acuta rispetto ad altre neoplasie linfatiche (Mischke et al, 2007). Occorre tenere in considerazione la bassa specificità delle APPs quando si decide di utilizzarle come marker tumorali (Ogilvie et al, 1993; Planella et al, 2009) e, allo stesso tempo, considerare i processi neoplastici come potenziali diagnosi differenziali in caso di aumento di CRP e Hp (Mischke et al, 2007).

3.2.2 NEOPLASIE MAMMARIE

Uno studio recente (Tecles et al, 2009) condotto su 60 cagne affette da **neoplasia mammaria** ha messo in evidenza concentrazioni ematiche di CRP e SAA più elevate nei soggetti con metastasi rispetto a quelli senza metastasi. Lo studio dimostra come l'aumento di CRP e/o SAA in soggetti con neoplasia mammaria senza segni clinici di infiammazioni concomitanti, possa essere quindi clinicamente rilevante. Le ipotesi avanzate dagli autori, volte a spiegare questo rilievo, sono essenzialmente 3:

- l'aumento di APPs in corso di metastasi può essere dovuto alla diretta invasione e danno tissutale da parte delle cellule neoplastiche;
- oppure può essere scatenato da mediatori infiammatori rilasciati durante questo processo.
- Una terza ipotesi è che i soggetti con metastasi possano avere un maggior grado di immunosoppressione e, di conseguenza, una maggior predisposizione ad infezioni secondarie.

Un altro studio dello stesso anno ha evidenziato una concentrazione significativamente maggiore di CRP e Hp nelle cagne affette da neoplasia mammaria rispetto al gruppo di

controllo, tuttavia con valori che si sovrappongono nei due gruppi. Inoltre non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa tra i soggetti con forme maligne e quelli con forme benigne, nemmeno tra i soggetti con metastasi e quelli senza (Planellas et al, 2009), screditando la CRP e l'Hp come marker utili per identificare il grado di malignità delle neoplasie.

3.3 APPs nei PROCESSI IMMUNOMEDIATI

I processi immunomediati sono tra le patologie che maggiormente scatenano una risposta di fase acuta nell'organismo. Per tale motivo, molti Autori hanno focalizzato, negli ultimi anni, i loro studi sulle APPs in corso di processi immunomediati e/o autoimmuni.

3.3.1 MENINGITE ARTERITE STEROIDO-RESPONSIVA

La meningite-arterite steroideo-responsiva (SRMA) è una delle forme di meningite più comunemente diagnosticata nella medicina canina (Tripold, 1995) e, fino ad oggi, l'efficacia del trattamento veniva monitorata attraverso l'osservazione dei segni clinici e ripetitive valutazioni di liquido cerebrospinale (CSF). L'invasività di tale procedura ha comportato la necessità di ricercare metodi più semplici ed immediati (Bathen-Noethe et al, 2008). Le proteine di fase acuta negli ultimi 5 anni hanno fornito la soluzione ideale per il monitoraggio della SRMA; alcuni studi mettono in evidenza, infatti, come le concentrazioni di CRP nel CSF, ma soprattutto quelle ematiche, siano significativamente più elevate in soggetti con SRMA rispetto a quelli con altre patologie neurologiche o a pazienti sani (Bathen-Noethe et al, 2008; Lowrie et al, 2009). Inoltre, le concentrazioni di CRP diminuiscono marcatamente durante il trattamento con corticosteroidi, in parallelo alla diminuzione del numero delle cellule nucleate nel CSF e alla risoluzione della sintomatologia clinica. Ne consegue che la CRP risulta, secondo

molti Autori, un ottimo marker per il monitoraggio della SRMA in corsi di terapia con corticosteroidi. Inoltre, Lowrie e collaboratori (2009) hanno evidenziato cospicui aumenti di CRP e SAA in soggetti con recidiva di SRMA, nei quali l'assenza di alterazioni del leucogramma e del CSF rendevano difficile la conferma della diagnosi. La CRP e la SAA sono, quindi, più sensibili rispetto agli altri marker fino ad oggi utilizzati e possono offrire un importante aiuto nella diagnosi e nel monitoraggio terapeutico di tale patologia (Lowrie et al, 2009b).

3.3.2 ANEMIA EMOLITICA AUTOIMMUNE (AIHA)

Sempre più studi dimostrano che in corso di emolisi acuta nella anemia emolitica autoimmune canina (AIHA) si verifica una risposta infiammatoria sistemica (Smith, 2007), la cui presenza è testimoniata dai rilievi di una leucocitosi, da moderata a marcata (Manus e Craig, 2001), e di una variazione della concentrazione di numerose APPs come la CRP (Caspi et al, 1987; Tecles et al, 2005; Mitchell et al, 2009; Griebisch et al, 2009), la Cp (Tecles et al, 2005), la AGP (Mitchell et al, 2009), il fibrinogeno (Scott-Moncrieff et al, 2001) e l'albumina (Carr et al, 2002). Sembra che, a differenza che in altre patologie come la leptospirosi (Mastorilli et al, 2007), le concentrazioni di CRP nella AIHA non abbiano un valore prognostico sull'outcome e sulla sopravvivenza del paziente (Griebisch et al, 2009; Mirchell et al, 2009), tuttavia, possono essere utili marker per il monitoraggio in corso di trattamento. Le concentrazioni di CRP e AGP, infatti, diminuiscono più rapidamente rispetto ai globuli bianchi, tornando ai valori basali in 7-9 giorni, dopo l'inizio del trattamento (Mitchell et al, 2009).

3.3.3 POLIARTRITE IDIOPATICA CANINA

Le APPs sono risultate utili in quelle patologie in cui mancano test diagnostici specifici e i cui sintomi possono essere vaghi e subdoli. La Poliartrite Idiopatica Canina, ad

esempio, può risultare difficile da diagnosticare, pertanto l'utilizzo di marker infiammatori come le APPs associato ad altri esami collaterali può essere di valido ausilio nel protocollo diagnostico (Ohno et al, 2006). In corso di Poliartrite idiopatica Canina le concentrazioni di CRP risultano molto elevate al momento della diagnosi, dimostrandosi più sensibili della conta leucocitaria, per poi diminuire molto rapidamente 6-13 giorni dopo il trattamento con corticosteroidi (Ohno et al, 2006).

3.4 APPs nelle PATOLOGIE su BASE INFETTIVA

Le APPs in medicina Veterinaria si sono rivelate particolarmente utili nella diagnosi, nel monitoraggio terapeutico e nella valutazione della prognosi in corso di patologie su base infettiva. Numerosi studi hanno dimostrato che una diminuzione delle concentrazioni di CRP in seguito ad una appropriata terapia è associata ad un miglioramento clinico (Galezowski et al, 2010), tuttavia non sempre esiste una correlazione significativa tra le concentrazioni di CRP all'ammissione del soggetto e l'outcome, pertanto una singola determinazione di CRP non facilita il clinico ad esprimere una prognosi sul paziente (Holm et al, 2004, Mastroilli et al, 2007; Griebisch et al, 2009), risulta, quindi, necessario effettuare misurazioni di CRP seriali. I soggetti in cui la CRP si avvicina progressivamente ai valori di riferimento hanno, infatti, un outcome migliore rispetto ai pazienti con una CRP che permane elevata (Galezowski et al, 2010).

3.4.1 BABESIOSI CANINA

Negli ultimi anni numerosi Autori hanno volto la loro attenzione alle proteine di fase acuta in corso di Babesiosi canina, Lobetti e collaboratori (2000) hanno descritto un aumento delle concentrazioni di AGP in cani affetti da Babesiosi. Due anni più tardi, Matijatko e collaboratori (2002), invece, hanno valutato l'aumento della CRP in corso di tale patologia e hanno sottolineato la correlazione tra la magnitudo di aumento e la gravità della malattia. Studi successivi hanno confermato tali reperti apportando di anno in anno nuove conoscenze sulla risposta di fase acuta in cani affetti da Babesiosi, nella quale si verifica un aumento non solo delle concentrazioni di AGP e CRP, ma anche di Cp (Ulutas et al, 2005), di Fibrinogeno (Shetters et al, 2009; Solano-Gallego et al, 2008) e di SAA (Matijatko et al, 2007). La CRP risulta più sensibile rispetto ai globuli bianchi e all'indice di eritrosedimentazione per la diagnosi e per il monitoraggio terapeutico (Matijatko et al, 2007). Inoltre Ulutas e collaboratori (2005) descrivono una significativa diminuzione dell'Hp nei soggetti affetti da Babesiosi, reperto non confermato dallo studio di Matijatko e collaboratori (2007) i quali descrivono un andamento irregolare delle concentrazioni di Hp. C'è da sottolineare che in questo ultimo studio, a differenza del precedente, vengono inclusi solo soggetti con Babesiosi non complicata, pertanto le concentrazioni di Hp potrebbero non subire l'influenza dell'imponente emolisi caratteristica dei casi più gravi.

3.4.2 EHRlichiosi CANINA

Studi sperimentali effettuati sul cane hanno messo in evidenza concentrazioni di CRP e di AGP maggiori nei cani infettati con Ehrlichia rispetto ai soggetti del gruppo di controllo (Rikihisa et al, 1994; Shimada et al, 2002), reperto evidenziato anche nei soggetti in cui non si è manifestato alcun segno clinico e/o alcuna alterazione ematobiochimica (Watanabe et al, 2006). Tali APPs raggiungono il picco di

concentrazione massima tra 1 e 26 giorni dopo l'inoculazione per poi decrescere rapidamente (Rikihisa et al, 1994; Shimada et al, 2002). Pertanto in corso di Ehrlichiosi canina, la misurazione di CRP ed AGP può aiutare il clinico ad interpretare la gravità dell'insulto infiammatorio nei soggetti malati (Rikihisa et al, 1994).

3.4.3 LESHMANIOSI CANINA

Al momento della diagnosi di Leishmaniosi, la maggior parte dei cani ha concentrazioni di CRP, Hp e Cp aumentate (Martinez-Subiela et al, 2002; Martinez-Subiela et al, 2003); per quanto concerne le concentrazioni di SAA, solo in alcuni casi se ne verifica un aumento significativo (Martinez-Subiela, 2003). Le concentrazioni di CRP e Cp diminuiscono significativamente durante il trattamento, pertanto tali proteine possono essere d'aiuto per il clinico durante il monitoraggio terapeutico della Leishmaniosi, tuttavia, occorre interpretare con cautela le concentrazioni di queste proteine in quanto il pattern di ognuna può risultare differente da soggetto a soggetto; le loro concentrazioni, infatti, diminuiscono durante il trattamento con tempistiche diverse da cane a cane (Martinez-Subiela et al, 2003), ne consegue che le concentrazioni di CRP e Cp devono essere valutate nel complesso del quadro clinico del paziente. Ad esempio è importante tenere conto che il trattamento con il meglumine antimoniato può causare una reazione locale nel sito di iniezione e quindi alterare le concentrazioni delle APPs ed occorre sottolineare che ad oggi non si conoscono gli effetti dei farmaci utilizzati in corso di Leishmaniosi sulle concentrazioni sieriche delle varie APPs (Martinez-Subiela et al, 2003).

3.5 APPs nelle PATOLOGIE su BASE INFIAMMATORIA

3.5.1 SIRS e SEPSI

Nei pazienti con sepsi, in Medicina Veterinaria, la mortalità è decisamente elevata con dati che raggiungono il 33-50% (Greenfield e Walshaw, 1987; King, 1994; Otto, 2002; De Laforcade et al, 2003); esistono meno informazioni in letteratura riguardo al tasso di mortalità, invece, dei cani affetti da SIRS non causata da agenti infettivi (Gebhardt et al, 2009). Tuttavia, in entrambi i casi (Tabella 3.1), è importante riconoscerle tempestivamente per poter impostare un protocollo terapeutico corretto e per valutare la prognosi del paziente (Gebhardt et al, 2009).

| | |
|--|-----------------------------------|
| SIRS (systemic inflammatory response sindrome)= ≥ 2 dei seguenti criteri SEPSI= SIRS+ infezione (istologico, microbiologico, e/o macroscopica evidenza di infezione) | |
| Ipo o ipertermia | <37,8 o >39,4 °C |
| Tachicardia | >140 battiti/minuto |
| Tachipnea | >20 atti/minuto |
| Leucopenia o leucocitosi | <6.0 o >16 WBCx10 ⁹ /L |
| Neutrofili Banda | >3% |

Tabella 3.1: criteri di inclusione per la SIRS e la sepsi (Modificato da: Hauptman et al, 1997; De Laforcade et al, 2003).

Le concentrazioni ematiche di CRP aumentano significativamente sia nei cani affetti da SIRS che nei cani in SEPSI e la variazione di tale proteina al secondo giorno di ricovero rispetto all'ammissione permette di avere indicazioni sull'outcome del paziente nel 78% dei soggetti; infatti, i soggetti in cui le concentrazioni di CRP diminuiscono al secondo

giorno di ricovero rispetto all'ammissione hanno una prognosi più favorevole rispetto ai soggetti in cui non ci sono variazioni di concentrazione di CRP durante i primi due giorni (Gebhardt et al, 2009), tuttavia la sola concentrazione di CRP all'ammissione può non aver alcuno significato prognostico nei soggetti critici (Chan et al, 2009)

3.5.2 PIOMETRA

L'utilizzo delle APPs si sta diffondendo progressivamente anche nel campo della chirurgia canina, soprattutto nel monitoraggio del periodo postoperatorio (Dąbrowski et al, 2009). Tali proteine si sono rivelate utili come marker oggettivi della gravità del processo infiammatorio, capaci di rilevare precocemente eventuali complicazioni in pazienti precedentemente sottoposti a chirurgia e quindi di suggerire al clinico la necessità di un rapido intervento terapeutico (Dąbrowski et al, 2009). Ad esempio, le concentrazioni di CRP, SAA e Hp risultano elevate in cagne affette da piometra (Yamamoto et al, 1993; Krzyzanowski et al, 2000; Dąbrowski et al, 2009), aumentano ulteriormente durante il giorno dell'intervento chirurgico, per poi diminuire progressivamente, in assenza di complicazioni postoperatorie, nei giorni successivi (Dąbrowski et al, 2009). Nelle cagne in cui, invece, si verificano complicanze quali ad esempio una grave infiammazione della linea di sutura, le concentrazioni di CRP permangono elevate anche dopo 4 giorni dall'intervento (Dąbrowski et al, 2009) fino a quando non si instaura un trattamento adeguato.

Talvolta distinguere una piometra da una iperplasia cistica endometriale-mucometra è importante per valutare quale approccio terapeutico attuare e quanto tempestivamente intervenire, a tale scopo alcuni Autori (Fransson et al, 2004) hanno valutato le proteine di fase acuta come potenziale marker differenziale. Lo studio di Fransson e collaboratori (2004) ha evidenziato una sensibilità del 97,7% e una specificità del 75% delle concentrazioni di CRP associate alla percentuale di neutrofili banda nel differenziare

una mucometra da una piometra. Tale sensibilità è maggiore rispetto ad altri marker fino ad oggi utilizzati, come ad esempio la sola percentuale di neutrofili banda o associata alla fosfatasi alcalina.

3.5.3 INFIAMMAZIONI GASTROINTESTINALI

Le proteine di fase acuta possono risultare utili nella diagnosi e monitoraggio di danni alla mucosa gastrica, le concentrazioni di CRP e SAA, infatti, aumentano significativamente un giorno dopo l'insulto e Hp e Fibrinogeno raggiungono il picco massimo di concentrazione 4 giorni dopo (Bayramli e Ulutas, 2008). Le APPs sono state inoltre oggetto di studio in corso di "*Inflammatory bowel disease*" (IBD) sia nell'uomo che nel cane. In Medicina Umana le APPs sono state studiate approfonditamente come marker laboratoristici nei pazienti con IBD e nella maggior parte degli studi l'aumento delle concentrazioni di CRP e AGP è ben correlato all'attività della patologia clinica (Prantera et al, 1988). In medicina canina, le APPs sono state studiate come potenziale ausilio nella caratterizzazione della gravità della malattia e nel monitoraggio durante il trattamento. Tali studi hanno messo in evidenza un aumento moderato (circa 6 volte il valore basale) delle concentrazioni di CRP e AGP nei soggetti affetti da IBD rispetto ai cani sani (Jergens et al, 2003; McCann et al, 2007, Jergens et al, 2010), tuttavia con una differenza statisticamente significativa solo nei soggetti con CIBDAI (Canine IBD activity index) superiore o uguale rispettivamente a 5 e 6 (Jergens et al, 2003), dato non confermato da McCann e collaboratori (2007). Le concentrazioni di SAA sembrano essere maggiori nei soggetti sani rispetto ai cani affetti da IBD, riscontro inatteso che non ha una trovata una spiegazione da parte degli Autori (Jergens et al, 2003). 14-21 giorni dopo l'inizio del trattamento con prednisone e metronidazolo, le concentrazioni di Hp aumentano e quelle di CRP diminuiscono significativamente (Tabella 3.2) (Jergens et al, 2003). Anche nei soggetti trattati solo con prednisone, le concentrazioni di CRP diminuiscono in modo significativo (Jergens et al, 2010). Pertanto la CRP può essere un

marker di attività infiammatoria potenzialmente utile nei cani con IBD moderata-grave (Jergens et al, 2003) soprattutto durante il monitoraggio terapeutico. Tuttavia occorre tenere presente che non tutti i soggetti con IBD mostrano valori di CRP elevati al momento della diagnosi, bensì solo un 43% circa dei cani malati (Jergens et al, 2003; McCann et al, 2007; Jergens et al, 2010).

| Variabile | Pre-trattamento | Post-trattamento | Valore P- |
|-------------|-----------------|------------------|-----------|
| CIBDAI | 5,5 ± 0,4 | 1,6 ± 0,3 | .0001 |
| SAA (ng/ml) | 14,1 ± 6,2 | 4,7 ± 0,8 | .5130 |
| Hp (mg/ml) | 2,5 ± 0,4 | 9,5 ± 1,1 | .0001 |
| CRP (µ/ml) | 10,4 ± 2,5 | 0,6 ± 0,1 | .0001 |
| AGP (µ/ml) | 363,4 ± 44,2 | 355,0 ± 52,1 | .8727 |

canina (Modificato da: Jersen et al, 2003).

3.5.4 PANCREATITE

L'aumento della CRP in Medicina Umana è stata associata ad una prognosi riservata nei soggetti con pancreatite. In Medicina Veterinaria questo aspetto è stato oggetto di interesse degli ultimi anni. Numerosi studi dimostrano che la CRP risulta marcatamente aumentata in corso di pancreatite acuta nel cane (Yamamoto et al, 1993; Holm et al, 2004; Mansfield et al, 2008), tuttavia le concentrazioni di CRP non sembrano correlate con l'outcome del paziente (Chan et al, 2006; Mansfield et al, 2008) tranne che nei soggetti in cui la CRP è stata valutata entro due giorni dall'esordio dei sintomi, inoltre, la misurazione seriale di tale proteina è un obiettivo ed effettivo metodo per monitorare la risposta al trattamento in corso di pancreatite (Mansfield et al, 2008)

3.6 APPs nella GRAVIDANZA

Le proteine di fase acuta hanno trovato una ulteriore applicazione nella diagnosi di gravidanza nella cagna, la quale fino ad oggi si attuava tramite l'ecografia dell'utero come metodo diagnostico maggiormente affidabile; tuttavia la gravidanza si può diagnosticare ecograficamente con certezza solo 24-28 giorni dopo l'accoppiamento (Nelson e Couto, 1998). Alcuni studi hanno dimostrato un aumento di concentrazioni ematiche delle APPs in corso di gravidanza: un aumento di Hp a 2-3 settimane, un aumento di Cp, glicoproteina e α -2 globulina a 4 settimane e di CRP durante la metà della gestazione (Eckersall et al, 1993; Vanucchi et al, 2002).

3.7 INFLUENZA dei FARMACI sulle APPs

Ancora oggi sono scarsi, in medicina veterinaria, i dati sull'influenza dei farmaci sulle concentrazioni sieriche delle proteine di fase acuta, tuttavia la scelta di monitoraggio terapeutico di qualunque patologia attraverso le concentrazioni delle APPs non deve prescindere dalla conoscenza di eventuali influenze che tale farmaco può avere su di esse. Il fenobarbitale a dosaggi terapeutici, ad esempio, determina un aumento delle concentrazioni di AGP (Hojo et al, 2002) la quale non viene influenzata, invece, dalla somministrazione di doxorubicina (Ogilvie et al, 1993); un altro esempio è l'aumento delle concentrazioni di Hp in seguito al trattamento con antielmintici per la filariosi cardiopolmonare (Tosa et al, 1993).

3.7.1 CORTICOSTEROIDI

L'influenza dei corticosteroidi sulla cinetica e magnitudo delle proteine di fase acuta è

tutt'oggi ancora oggetto di studio. È ormai scientificamente dimostrato che i corticosteroidi esogeni ed endogeni comportano un aumento delle concentrazioni ematiche di Hp (Harvey e West, 1987; McGrotty et al., 2003; McGrotty et al., 2005) determinando un incremento delle proteine che migrano in α all'elettroforesi sierica, tuttavia non è ancora bene chiara l'influenza sulla CRP. Alcuni Autori in passato hanno affermato che la CRP, a differenza dei globuli bianchi, non viene influenzata dalla somministrazione di prednisolone (Yamamoto et al, 1994; Martinez-Subiela et al, 2004), tuttavia studi più recenti dimostrano il contrario. In corso di anemia emolitica autoimmune, infatti, la concentrazione media di CRP al momento della diagnosi è significativamente maggiore nei soggetti che non hanno ricevuto corticosteroidi (Tabella 3.3) (Mitchell et al, 2009), inoltre esiste una correlazione negativa tra il numero di trattamenti con corticosteroidi ricevuti prima della diagnosi e le concentrazioni di CRP (Mitchell et al, 2009). Tali risultati suggeriscono che la somministrazione di corticosteroidi sopprime la risposta responsabile della produzione di CRP, tuttavia non viene influenzata la concentrazione di AGP e di Albumina. Tale reperto potrebbe essere attribuito alla più lunga emivita di queste due ultime proteine rispetto a quella della CRP (Mitchell et al, 2009).

Un ulteriore studio degli ultimi anni (Ohno et al, 2006) effettuato su un gruppo di cani affetti da poliartrite idiopatica descrive come, in seguito alla somministrazione di corticosteroidi, le concentrazioni di CRP calano drammaticamente in tutti i soggetti già dopo pochi giorni dall'inizio del trattamento (Ohno et al, 2006).

Come precedentemente accennato, la Hp nel cane è particolarmente sensibile agli effetti dei **corticosteroidi**, infatti alte concentrazioni di tale proteina si evidenziano dopo trattamento con corticosteroidi (Martinez-Subiela et al, 2004; Cerón et al, 2005; Lowrie et al, 2009). Questo aspetto potrebbe limitare l'uso delle APPs nel monitoraggio dell'infiammazione in corso di terapie con corticosteroidi. Ad esempio, durante il trattamento della meningite-arterite steroideo-responsiva (SRMA), il monitoraggio terapeutico attraverso la misurazione delle concentrazioni di Hp è risultato non correlato

alla remissione clinica (Lowrie et al, 2009) in quanto le concentrazioni ematiche di tale proteina aumentano progressivamente durante il trattamento come anche durante il trattamento in corso di IBD (Jergens et al, 2003) (Tabella 3.2). Tuttavia, una più completa conoscenza dei meccanismi coinvolti può portare a nuovi utilizzi di questi biomarker.

| APPs | Corticosteroidi | No corticosteroidi | Valore P- |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------|
| CRP ($\mu\text{g/ml}$) | 115,3 \pm 58,5 (39,5-261,1) | 191,2 \pm 101,2 (77,0-435,1) | .02 |
| AGP ($\mu\text{g/ml}$) | 1457,7 \pm 569,8 (659,8-2383,6) | 1656,1 \pm 1137,7 (331,9-3677,0) | .55 |
| Albumina (g/l) | 31,8 \pm 5,0 (25,0-41,0) | 34,1 \pm 3,1 (27,0-37,0) | .21 |

Tabella 3.3: comparazione delle concentrazioni iniziali di APPs (media \pm DS, valore massimo e minimo) in cani con AIHA che hanno ricevuto (17 cani) e non hanno ricevuto (10 cani) corticosteroidi prima della valutazione (Modificato da: Mitchell et al, 2009).

3.7.2 FANS

Gli studi sull'effetto dei farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) sono ad oggi ancora scarsi. Uno studio sperimentale interessante è stato effettuato nel 2003 da alcuni Autori svizzeri (Borer et al, 2003). In 12 Beagle è stata indotta sperimentalmente una artrite acuta. In questi soggetti è stato intrapreso dopo tre ore dall'insulto un trattamento con Carprofen, Etodolac, Meloxicam o Butorfanolo. La misurazione della CRP ematica è stata effettuata prima dell'insulto e dopo 3, 9 e 24 ore (Figura 3.1). Dopo 24 ore dall'insulto e 21 ore dall'inizio della terapia, le concentrazioni di CRP erano ancora significativamente maggiori rispetto al gruppo di controllo. Tenendo conto che questi FANS raggiungono il picco di concentrazione plasmatica massima (Tmax) in poche ore

dalla somministrazione (Borer et al, 2003).

| FANS | Tmax in ore | T1/2 |
|-----------|-------------|-----------|
| Carprofen | 1-3 ore | 7-9 ore |
| Meloxicam | 7,5 ore | 23 ore |
| Etodolac | 0,5-1 ora | 10-14 ore |

Tabella 3.4: picco di concentrazione plasmatica massima (Tmax) e vita media (T1/2) espresse in ore di tre differenti FANS.

Nonostante il trattamento con FANS, quindi, dopo 21 ore la CRP permane alta. Occorre tenere in considerazione che questi soggetti hanno ricevuto una sola somministrazione di FANS e che forse le concentrazioni di CRP potrebbero necessitare di più ore per diminuire (Borrer et al, 2003); un'altra ipotesi è che, poiché la produzione di CRP è principalmente indotta dalla IL-6 e i FANS non bloccano direttamente la produzione dell'IL-6, tali molecole possano avere un'influenza insignificante sulle concentrazioni di CRP nel cane (Borrer et al, 2003).

3.8 APPs nelle PATOLOGIE ENDOCRINE

Le APPs sono state principalmente studiate nell'ambito della Sindrome di Cushing nel cane come modello di ipercortisolismo, scarsi o nulli sono i dati in letteratura sulla cinetica delle APPs in corso di altre endocrinopatie come il diabete mellito o l'ipotiroidismo.

3.8.1 IPERCORTISOLISMO

L'influenza dei corticosteroidi endogeni, al pari di quelli esogeni, può essere determinante nella concentrazione ematica delle APPs. I valori di AGP risultano elevati nel 30% dei soggetti affetti da ipercortisolismo spontaneo, tale fenomeno potrebbe

essere attribuito ad eventuali infezioni secondarie come ad esempio cistiti (Yuki et al, 2010). Le concentrazioni di Hp, come precedentemente affermato, sono fortemente influenzate dai corticosteroidi, ne consegue che anche nei soggetti affetti da ipercortisolismo spontaneo si verifichi un significativo aumento della Hp (Harvey e West, 1987; Martínez-Subiela et al, 2004; Arteaga et al, 2010) la quale diminuisce progressivamente durante il trattamento con trilostano (Mc Grotty et al, 2005). Uno studio effettuato su 11 cani con ipercortisolismo spontaneo ha messo in evidenza elevate concentrazioni di Hp nel 100% dei soggetti, i quali, raggiunto un buon controllo della patologia con il trattamento con trilostano, hanno mostrato concentrazioni di tale proteina nella norma (Tabella 3.5) (Arteaga et al, 2010).

| APPs | PRE-TRATTAMENTO range di concentrazioni | POST-TRATTAMENTO range di concentrazioni |
|-------------|--|---|
| Hp (g/l) | 2,8-13,6 | 1,5-8,1 * |
| CRP (µg/ml) | 0-27,5 | 0,32-41,5 |
| SAA (µg/ml) | 0,0-9,5 | 0-14,9 * |

Tabella 3.5: concentrazione di Hp, CRP e SAA in 11 cani affetti da ipercortisolismo spontaneo prima e dopo il trattamento con trilostano. () indica una differenza statisticamente significativa tra i valori pre e post trattamento (Modificato da Arteaga et al, 2010).*

Uno studio nato dalla collaborazione di Autori italiani e spagnoli (Caldin et al, 2009) ha messo in evidenza concentrazioni di CRP simili tra il gruppo di 39 cani affetti da ipercortisolismo spontaneo (HAC) non complicato e il gruppo di cani sani. Tuttavia, il gruppo di cani con HAC e concomitanti gravi infezioni/infiammazioni, ha mostrato concentrazioni di CRP significativamente inferiori rispetto ai cani affetti da sepsi ma senza HAC. Le concentrazioni di CRP nei cani con HAC, quindi, sembrano aumentare in seguito ad uno stimolo infiammatorio in modo più blando rispetto a cani che non

hanno un ipercortisolismo (Caldin et al, 2009). La spiegazione ipotizzata dagli Autori è che i corticosteroidi, sopprimendo l'espressione genica delle citochine come la citochina IL-1, possano determinare una diminuzione delle concentrazioni di CRP (Caldin et al, 2009).

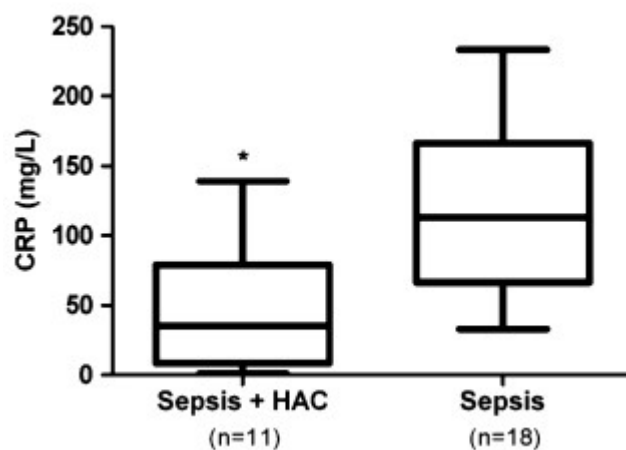


Figura 3.2: concentrazioni di CRP in cani affetti da ipercortisolismo (HAC) e sepsi e in cani con sola sepsi (Modificato da: Caldin et al, 2009).

3.9 QUANDO le APPs NON SONO UTILI

Se in numerose condizioni patologiche le proteine di fase acuta si sono dimostrate utili marker, in altre patologie la loro utilità è risultata scarsa o dubbia. Ad esempio in pazienti affetti da osteoartrite, un'unica misurazione di CRP non è risultata utile per distinguere i soggetti sani da quelli malati (Hurter et al, 2005; Fujiki et al, 2007), in alcuni soggetti con con patologie gastrointestinali o a carico dell'apparato urinario come gastroenteriti, dilatazione gastrica, volvi e urolitiasi non si verificano aumenti significativi di CRP (Yamamoto et al, 1993; Nakamura et al, 2008; Galezowski et al, 2010). Pertanto in tali patologie non ci si deve aspettare una magnitudo di aumento delle APPs positive al pari di quelle evidenziate in corso di patologie

infettive/infiammatorie o immunomediate.

3.10 PROFILI di APPs

Poiché l'aumento di ciascuna proteina di fase acuta è altamente sensibile ma non specifico per una determinata malattia, è stato proposto da alcuni Autori l'utilizzo di profili biochimici composti da più proteine di fase acuta in modo da aumentare la specificità dei singoli parametri (Skinner, 2001; Ceròn et al, 2005); l'utilizzo di differenti APPs abbinate, inoltre, può risultare utile per comprendere l'evoluzione temporale del processo patologico (Ceròn et al, 2005). Tali profili dovrebbero comprendere almeno una APP maggiore, una moderata ed una negativa; ad esempio un aumento di CRP e Cp con concomitante diminuzione della Hp può far sospettare una babesiosi (Ulutas et al, 2005), un aumento di Hp con concomitante CRP nella norma può far sospettare un ipercortisolismo spontaneo o iatrogeno (Caldin et al, 2009). Secondo alcuni autori lo studio delle APPs raggruppate in profili potrà portare in futuro a capire quali APPs sono maggiormente applicabili in una determinata patologia e a promuovere la diffusione di tali marker nella pratica clinica Veterinaria (Ceròn et al, 2005).

CAPITOLO 4

Corticosteroidi Endogeni ed Esogeni nel cane

4.1 INTRODUZIONE

L'ipercortisolismo è una condizione comune nel cane e può essere definito come gli effetti fisici e biochimici esiti di una esposizione prolungata ad inappropriate ed elevate concentrazioni di cortisolo (Kooistra e Galac, 2010). Questa condizione può essere di origine iatrogena, in seguito alla somministrazione di glucocorticoidi per il trattamento di patologie su base allergica, autoimmune, infiammatoria o neoplastica (Kooistra e Galac, 2010), oppure di origine spontanea e causare un complesso di sintomi ed alterazioni laboratoristiche che descrivono la cosiddetta “Sindrome/Malattia di Cushing”. Lo sviluppo di segni clinici legati all'eccesso di glucocorticoidi dipende dalla gravità e dalla durata dell'esposizione all'ormone, tuttavia gli effetti variano anche da soggetto a soggetto in quanto esistono differenze individuali per quanto concerne la sensibilità al cortisolo (Kooistra e Galac, 2010).

4.2 IPERCORTISOLISMO SPONTANEO

Nel 1932 il neurochirurgo francese Harvey Cushing descrisse per la prima volta una strana sindrome connessa alla presenza di “cellule basofile anomale” a livello di ghiandola pituitaria. Oggi tale patologia è ben conosciuta e viene denominata “malattia

di Cushing” nella forma ipofisi-dipendente, o “sindrome di Cushing” nelle forme non-ipofisi dipendenti. Tale patologia prende anche il nome di iperadrenocorticismo o, più correttamente, ipercortisolismo spontaneo.

4.2.1 EPIDEMIOLOGIA

La Sindrome di Cushing si manifesta generalmente in soggetti adulti e anziani, di età compresa tra i 6 e i 16 anni, con una media di circa 10 anni nei soggetti con forma ipofisaria e di 11 anni in quelli con forma surrenalica (Feldman e Nelson, 2004), raramente, tale patologia si manifesta in soggetti più giovani (Kooistra e Galac, 2010). La disendocrinia può colpire qualsiasi razza, tuttavia è maggiormente descritta in quelle di piccola taglia come ad esempio il Barbone Nano e il Bassotto (Kooistra e Galac, 2010) ma anche nel Beagle, nel Boxer, nel Labrador, nel Pastore Tedesco e nei vari Terrier (Feldman e Nelson, 2004). L'incidenza delle neoplasie ipofisarie è maggiore nei soggetti di peso inferiore ai 20 Kg (75%) e nelle femmine (55-60%), le forme surrenaliche, invece, mostrano un'incidenza del 50% nei soggetti di peso superiore ai 20 Kg e nelle femmine (60-65%) (Reusch e Feldman, 1991).

4.2.2 EZIOPATOGENESI

La malattia/sindrome di Cushing viene definita come l'insieme delle alterazioni cliniche e laboratoristiche connesse ad uno stato di ipercortisolemia cronica (Feldman e Nelson, 2004). In base all'eziopatogenesi è possibile distinguere diverse forme di ipercortisolismo spontaneo, si può parlare di forme ACTH-dipendenti, che si sviluppano, quindi, in seguito ad un'eccessiva produzione di ACTH o di forme ACTH-

indipendenti, cioè che nascono da un'autonoma ipersecrezione di glucocorticoidi (Kooistra e Galac, 2010). Della prima categoria fanno parte le neoplasie pituitarie e i casi di produzione ectopica di ACTH, della seconda invece le forme surrenaliche.

4.2.2.1 Forma ipofisaria o Pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH)

Circa l'85% dei cani con ipercortisolismo spontaneo presenta questa forma (Feldman e Nelson, 2004) è sostenuta da una neoplasia pituitaria ACTH-secerne. L'eccessiva secrezione di ACTH determina un'iperplasia surrenalica bilaterale ed una conseguente ipersecrezione di glucocorticoidi da parte della corticale del surrene (Feldman, 1983). Nella maggior parte dei casi si tratta di tumori benigni, più frequentemente sono microadenomi, nel restante 15-25% dei casi risultano essere, invece, macroadenomi (Duesberg et al., 1995).

4.2.2.2 Produzione ectopica di ACTH

Un'altra forma di ipercortisolismo ACTH-dipendente è causata dalla produzione ectopica di ACTH. Nell'uomo tale patologia è ben conosciuta ed è caratterizzata dalla produzione di ACTH da parte di neoplasie non ipofisarie, quali, ad esempio, carcinomi polmonari; ciò determina un'abnorme stimolazione delle surrenali con conseguente iperplasia bilaterale ed iperproduzione di cortisolo. Tale forma è stata recentemente descritta in un Pastore Tedesco con una neoplasia pancreaticca (Galac et al., 2005).

4.2.2.3 Forma surrenalica o Adrenal-dependent hyperadrenocorticism (ADH)

La forma surrenale-dipendente, detta anche ACTH-indipendente, colpisce il 15-20% dei soggetti affetti da ipercortisolismo spontaneo (Kooistra e Greco, 2010) ed è sostenuta solitamente da **adenomi o carcinomi** a carico della corticale delle surrenali. Tali neoplasie secernono un'eccessiva quantità di cortisolo indipendentemente dal controllo pituitario; solitamente sono monolaterali, tuttavia sono segnalati anche casi di tumori a carico di entrambe le ghiandole (Reusch e Feldman, 1991). Lo stato di ipercortisolemia determina una soppressione nella produzione di ACTH da parte dell'adenoipofisi, con conseguente atrofia della porzione di ghiandola non neoplastica e della surrenale controlaterale. Se pur raramente, la forma ipofisi-dipendente e surrenale-dipendente possono coesistere nello stesso soggetto (Greco et al., 1999). Una seconda forma di ipercortisolismo ACTH-indipendente è scatenata da un'**iperplasia surrenalica bilaterale macronodulare** la quale esita da una aberrante espressione di recettori surrenalici anomali (Lacroix et al, 2001; Christopoulos et al, 2005; Galac et al, 2005).

4.2.3 SEGNI CLINICI

Una cronica esposizione a livelli eccessivi di cortisolo si manifesta con un'ampia serie di segni clinici caratteristici che, tuttavia, possono manifestarsi con variabili quadri di intensità o non essere sempre presenti.

Poliuria e polidipsia: sono segni estremamente comuni in corso di ipercortisolismo (80-85% dei soggetti) e sono spesso il motivo principale che spinge il proprietario a richiedere il consulto veterinario (Feldman e Nelson, 2004). Un soggetto con iperadrenocorticismismo beve una quantità di acqua da 2 a 10 volte superiore alla norma, quindi superiore ai 100 ml/Kg/die. Il cortisolo, prodotto in elevate quantità, interferisce con l'azione dell'ormone antidiuretico a livello di tubuli collettori distali

renali, determinano una forma di diabete insipido nefrogenico secondario (Biewenga et al., 1991), inoltre s'instaura uno stato di diabete insipido centrale, con una vera e propria carente secrezione di ormone antidiuretico (Mulnix et al., 1976).

Polifagia: nel cane, l'aumento dell'appetito sembra essere un effetto diretto dei glucocorticoidi. La polifagia si manifesta in più del 90% dei casi di ipercortisolismo e probabilmente è dovuta ad un'azione anti-insulinica del cortisolo, il quale riduce l'utilizzo del glucosio da parte dei tessuti.

“Addome a botte”: questo sintomo è rilevabile nel 80% dei cani con ipercortisolismo ed è la conseguenza di un aumento del contenuto addominale e di una diminuzione della tonicità dei muscoli addominali dovuta agli effetti proteocatabolici del cortisolo. L'aumento del contenuto addominale è attribuibile alla redistribuzione dei grassi corporei con accumulo a livello omentale, all'epatomegalia, per infiltrazione lipidica ed accumulo di glicogeno, e alla sovradistensione cronica della vescica (Feldman e Nelson 2004).

Astenia muscolare e letargia: l'astenia muscolare si manifesta con intolleranza all'esercizio, difficoltà nel salire le scale e nel compiere sforzi fisici intensi ed è il risultato del catabolismo proteico mediato dai glucocorticoidi che si ripercuote sul tessuto muscolare nel 75-85% dei soggetti con Sindrome di Cushing (Feldman e Nelson, 2004). La letargia è probabilmente l'espressione dell'astenia e del danno muscolare (Feldman e Nelson, 2004).

Manifestazioni cutanee: le alterazioni cutanee, in corso di ipercortisolismo, sono frequenti e solitamente non sono associate a prurito (Feldman e Nelson, 2004). L'alopecia simmetrica bilaterale è uno dei sintomi più comuni, si localizza, generalmente, a livello del tronco risparmiando la testa e gli arti ed è il risultato di un'atrofia follicolare e pilosebacea che determina caduta del pelo e mancata ricrescita. La cute si presenta ipotonica e notevolmente assottigliata, con una marcata tendenza a sviluppare ematomi, petecchie e soffusioni. Inoltre, la cute è più soggetta ad infezioni secondarie, conseguenti all'effetto immunosoppressivo dei glucocorticoidi (Scott et al,

2001), sostenute da batteri, miceti o acari come il demodex (Hillier e Desch, 2002). Spesso si evidenziano comedoni attorno ai capezzoli e lungo la linea mediana dorsale e, talvolta, possono essere presenti lungo tutto il tronco; non di rado si sviluppano aree di iperpigmentazione focale o diffusa. Rilievo meno comune (2-8%) è invece la “Calcinosis cutis” (Peterson, 1984), cioè una deposizione distrofica di calcio nel derma e nel sottocute, di cui non si conosce ancora completamente il meccanismo eziopatogenetico.

Dispnea: i soggetti affetti da ipercortisolismo manifestano un aumento della deposizione di grassi a carico del torace e una debolezza muscolare che coinvolge anche i muscoli respiratori, questi fattori possono determinare l’insorgenza di dispnea. L’aumento della pressione, esercitata sul diaframma dall’accumulo di grassi in addome, associato all’epatomegalia, può accentuare i disturbi del meccanismo di ventilazione. Altre cause includono la mineralizzazione dell’interstizio polmonare e il tromboembolismo polmonare (Feldman e Nelson, 2004).

Sintomi meno comuni: cani affetti da ipercortisolismo possono raramente manifestare segni legati all’apparato riproduttivo quali atrofia testicolare o anestro. Un altro fenomeno piuttosto raro sono le miotonie, raramente i cani con ipercortisolismo sviluppano una miopatia caratterizzata da contrazioni muscolari persistenti e rigidità muscolare evidenziabili con alterazioni all’elettromiografia. La causa di tale alterazione nel cane è ancora sconosciuta (Feldman e Nelson, 2004).

Sintomatologia neurologica: nei soggetti affetti da un macroadenoma ipofisario, la compressione sulle strutture circostanti può determinare una sintomatologia neurologica caratterizzata da alterazioni dello stato mentale come ad esempio ottundimento del sensorio, stupor, atassia, tetraparesi, disorientamento e compulsione (Kipperman et al., 1992).

4.2.4 ESAMI di LABORATORIO

Le alterazioni ematobiochimiche possono, insieme alla presenza dei segni clinici caratteristici, aiutare il clinico ad emettere il sospetto di Sindrome/Malattia di Cushing. Occorre evidenziare che anche queste, al pari dei sintomi, non sono sempre presenti e non sono patognomoniche di tale disendocrinia.

4.2.4.1 Esame Emocromocitometrico

La classica alterazione ematologica presente in corso di ipercortisolismo è il cosiddetto “leucogramma da stress”, l’80% dei soggetti, infatti, manifesta una linfopenia ed una eosinopenia e il 20-25% mostra un lieve aumento dei leucociti totali (Feldman e Nelson, 2004). L’eccessiva produzione di cortisolo, infatti, causa una demarginazione dei neutrofili e dei monociti dall’endotelio dei capillari, determinando un maggior numero di neutrofili e monociti nel comparto circolante. Un altro rilievo comune è la trombocitosi (Reusch, 2005), più raramente si può riscontrare una lieve eritrocitosi.

4.2.4.2 Profilo Biochimico

Il rilievo ematobiochimico più comunemente evidenziato è l’aumento della fosfatasi alcalina (SAP) (Teske et al., 1989). L’eccesso di cortisolo endogeno determina, infatti, un aumento della fosfatasi alcalina corticosteroido-indotta (Solter et al., 1994). L’85% dei soggetti affetti da ipercortisolismo presenta valori di fosfatasi alcalina superiori a 150 UI/L e frequentemente tali valori superano i 1000 UI/L (Feldman e Nelson, 2004). Gli enzimi epatici, soprattutto l’alanino aminotransferasi (ALT), sono generalmente aumentati a causa dell’epatopatia indotta dagli steroidi. Inoltre, i glucocorticoidi

stimolano la lipolisi determinando, quindi, un aumento della lipemia e del colesterolo sierico nel 90% dei soggetti (Feldman e Nelson, 2004). L'insulino-resistenza e l'attivazione della gluconeogenesi epatica, causate dal cortisolo endogeno, possono determinare un moderato aumento della glicemia che solo nel 5-10% dei soggetti sfocia in un diabete mellito clinicamente manifesto (Feldman e Nelson, 2004). Nel 38% dei soggetti l'azotemia e la creatininemia possono essere inferiori all'intervallo di riferimento a causa dell'accentuata diuresi (Reusch e Feldman, 1991). Anche gli elettroliti sierici possono mostrare delle alterazioni, nel 33% dei soggetti, infatti, viene evidenziata una ipofosfatemia causata dall'aumento dell'escrezione renale dei fosfati (Peterson, 1984), il 50% dei soggetti mostra un aumento della natremia e un lieve calo della potassiemia (Feldman e Nelson, 2004).

4.2.4.3 Esame chimico-fisico delle urine

L'alterazione più comunemente riscontrabile nelle urine di cani affetti da ipercortisolismo è la diminuzione del peso specifico. Nel'85% dei soggetti, infatti, il peso specifico urinario risulta inferiore a 1.020 (Feldman e Nelson, 2004). Circa il 40-50% dei soggetti presenta infezioni alle vie urinarie (Forrester et al, 1999); l'immunosoppressione mediata dai glucocorticoidi, la sovradistensione cronica della vescica e la presenza di urine diluite facilitano, infatti, l'insorgenza di infezioni a carico delle basse vie urinarie (Lulich e Osborne, 1994).

4.2.5 DIAGNOSI

Tutti i test utilizzati per la diagnosi di ipercortisolismo spontaneo si avvalgono della misurazione di cortisolo su plasma o su urine, tuttavia, indipendentemente da quali test vengano effettuati, occorre sempre tenere in considerazione il quadro clinico del

soggetto. La diagnosi dipende dalla dimostrazione di due principali caratteristiche: l'aumentata produzione di cortisolo e la diminuita sensibilità al feedback negativo dei glucocorticoidi (Kooistra e Galac, 2010).

4.2.5.1 Test di Stimolazione con ACTH

Il test di stimolazione con ACTH è il test più comunemente utilizzato per confermare la diagnosi di ipercortisolismo nel cane. Si tratta di un test semplice, relativamente poco costoso e veloce. Valutando la risposta delle surrenali in seguito alla somministrazione di ACTH esogeno è possibile confermare la diagnosi di ipercortisolismo spontaneo o di identificare soggetti affetti da forma iatrogena (Kooistra e Galac, 2010). È un test dotato di una sensibilità dell'87% per i soggetti affetti da PDH e del 61% per i cani affetti da ADH. La specificità è stimata intorno al 64-86% (tabella 1)(Behrend e Kennis, 2010).

Numerosi sono i protocolli pubblicati in letteratura, tuttavia, quello più comunemente utilizzato prevede la misurazione del cortisolo ematico basale e dopo 1 ora dalla somministrazione di 0,25 mg di ACTH sintetico per via endovenosa o intramuscolare (Feldman et al., 1982). Un soggetto normale presenta valori basali di cortisolo ematico compresi tra 0.5 e 6.0 g/dl (Feldman e Nelson, 2004). Tipicamente i valori post-stimolazione sono compresi tra 6 e 17 µg/dl, valori compresi fra 17 e 22 µg/dl sono considerati dubbi e non diagnostici, invece valori post-stimolazione superiori a 22 µg/dl sono indicativi di ipercortisolismo spontaneo (Feldman e Nelson, 2004). Circa l'85% dei soggetti con forma ipofisaria hanno una risposta positiva al test, solo il 55% dei cani con forma surrenalica invece mostrano un risultato positivo. La presenza di alte percentuali di falsi negativi in corso di ADH deriva dalla mancanza di sensibilità all'ACTH che talvolta si verifica in corso di neoplasie surrenaliche (Peterson et al., 1982); secondo alcuni Autori, questo test non è raccomandato per l'approccio diagnostico all'ipercortisolismo spontaneo (Feldman, 2005).

Soggetti affetti dai ipercortisolismo iatrogeno mostrano valori basali di cortisolo ematico bassi o normali, tuttavia tali valori non subiscono variazioni in seguito alla somministrazione di ACTH esogeno.

La misurazione del solo cortisolo basale ha un valore diagnostico decisamente scarso in quanto le sue concentrazioni ematiche fluttuano durante la giornata (Kooistra e Galac, 2010).

4.2.5.2 Test di soppressione con desametasone a basse dosi (LDDSt)

Questo test è sia diagnostico che discriminante, permette, quindi, di differenziare forme di PDH da forme di ADH sfruttando il feedback negativo del cortisolo sulla liberazione di ACTH. In un cane sano, infatti, la somministrazione di corticosteroidi esogeni, induce un blocco della liberazione di ACTH da parte dell'ipofisi e quindi una mancata produzione di cortisolo da parte delle surrenali. La riduzione della cortisolemia si avverte già dopo 2-3 ore dalla somministrazione endovenosa di desametasone e può perdurare per 8-48 ore (Feldman e Nelson, 2004).

Il protocollo di esecuzione del test prevede la misurazione dei livelli di cortisolo ematico basali e dopo 4 ore e 8 ore dalla somministrazione endovenosa di 0.01 mg/kg di desametasone. La cortisolemia all'ottava ora permette di confermare la diagnosi di ipercortisolismo; il test viene considerato negativo se la cortisolemia all'ottava ora risulta inferiore a 1 µg/dl. Valori compresi tra 1 µg/dl e 1.4 µg/dl indicano una risposta dubbia al test e valori superiori a 1.4 µg/dl, invece, confermano la diagnosi di ipercortisolismo (Feldman e Nelson, 2004). La cortisolemia rilevata dopo 4 ore dalla somministrazione del desametasone permette di differenziare, nella maggioranza dei casi, soggetti affetti da PDH piuttosto che da ADH. In un soggetto sano la cortisolemia si abbassa a livelli inferiori a 1.4 µg/dl già a 4 ore dalla somministrazione del desametasone e perdura anche dopo 8 ore.

In soggetti affetti da PDH si possono avere diversi tipi di risposta a 4 ore dalla somministrazione di desametasone:

- Il 20% dei soggetti non mostra alcuna soppressione del cortisolo ematico come nei soggetti affetti da ADH.
- Un altro 20% dei soggetti mostra una lieve soppressione.
- Il 30-40% dei soggetti ha un cortisolo alla quarta ora inferiore più del 50% rispetto al basale ma non inferiore a 1.4 µg/dl.
- Il restante 25% dei soggetti il cortisolo ematico a 4 ore scende a livelli inferiori a 1.4 µg/dl.

Nei primi due casi risulterà impossibile distinguere PDH da ADH e si avrà semplicemente la conferma diagnostica di ipercortisolismo. Ne consegue che solo nel 60% dei soggetti affetti da PDH si ottiene una risposta chiara al test di soppressione con desametasone. Nei soggetti affetti da ADH, invece, non si ha alcuna soppressione della produzione di cortisolo da parte delle surrenali. Il test può comunque risultare dubbio nel caso in cui ci sia una apparente soppressione del cortisolo ematico alla 4 ore dalla somministrazione del desametasone che in realtà è scatenata da una lieve, casuale e temporanea fluttuazione del cortisolo ematico verificatasi al momento del prelievo (Feldman et al., 1996).

Il LDDSt può fornire dei risultati falsamente positivi in seguito allo stress dell'ospedalizzazione e dei prelievi ematici (Chastain et al, 1986), possiede una sensibilità del 95% e una specificità più bassa.

4.2.5.3 Test di soppressione con desametasone ad alte dosi (HDDSt)

L'utilizzo di questo test è consigliato in quei casi in cui il LDDSt non è stato in grado di differenziare ADH da PDH. Infatti, una neoplasia ipofisaria che non ha risposto alla

dose di 0,01 mg/Kg di desametasone potrebbe rispondere a dosi maggiori; invece, in corso di neoplasia surrenalica non ci sarà alcuna soppressione del cortisolo ematico indipendentemente dalla dose utilizzata (Feldman e Nelson, 2004).

Questo test si effettua allo stesso modo del precedente con la differenza che il dosaggio del desametasone somministrato è 10 volte maggiore; il protocollo prevede, infatti, la somministrazione endovenosa di 0,1 mg/Kg (Feldman et al., 1996). Non bisogna dimenticare che, anche con questo test, circa il 15-25% dei casi di PDH non manifesta alcuna soppressione, presentandosi quindi come un ADH (Behrend e Kemppainen, 2001).

4.2.5.4 Rapporto Cortisolo urinario/Creatinina (UC:CR)

La misurazione del cortisolo urinario (UC) rapportato alla creatinina urinaria (CR) permette di ovviare alle fluttuazioni della cortisolemia, in quanto le urine vengono raccolte e miscelate nella vescica per diverse ore e riflettono la produzione media di cortisolo (Kooistra e Galac, 2010). In soggetti affetti da ipercortisolismo, l'escrezione urinaria di cortisolo aumenta come conseguenza di una maggior secrezione da parte delle surrenali (Jones et al., 1990). L'UC:CR è un test di facile esecuzione, rapido, non invasivo e possiede un'accuratezza diagnostica elevata fornendo risultati più attendibili rispetto alla sola cortisolemia basale (Rijnberk et al., 1988; Kooistra e Galac, 2010). Per evitare l'influenza dello stress, il campione di urine deve essere raccolto a casa dal proprietario, almeno un giorno dopo la visita clinica del veterinario. Questo test è dotato di una bassa specificità, infatti può risultare positivo anche in corso di altre patologie, tuttavia ha una sensibilità del 100% (Reusch, 2005).

Il rapporto UC:CR di per sé è un test semplicemente diagnostico, per renderlo discriminante si può utilizzare tale rapporto abbinato alla somministrazione di desametasone ad alte dosi. Il test UC:CR con desametasone ad alte dosi si effettua

prelevando le urine per caduta per 2 mattine consecutive e somministrando per tre volte a distanza di 8 ore, 0,1 mg/Kg di desametasone per bocca dopo il secondo prelievo di urine. Un terzo campione di urine deve essere prelevato dopo 8 ore dalla terza somministrazione di desametasone. Sui tre campioni di urine si valuta l'UC:CR. Tale test è considerato indicativo di PDH qualora l'UC:CR del terzo campione risulti inferiore più del 50% rispetto al valore medio dell'UC:CR dei primi due campioni.

4.2.5.5 Test con la Desmopressina (DDAVP)

Uno studio recente ha mostrato che la somministrazione endovenosa di 4 µg di desmopressina non aumenta le concentrazioni plasmatiche di cortisolo in cani con forma surrenalica, invece il 75% dei soggetti con forma ipofisaria hanno un aumento di più del 10% delle concentrazioni di cortisolo ematico rispetto al valore basale (Zeugswetter et al, 2008), pertanto tale test può risultare utile nel differenziare l'origine dell'ipercortisolismo.

4.2.5.6 Ecografia addominale

L'ecografia addominale permette di valutare la forma e la dimensione delle ghiandole surrenali e di evidenziare la presenza di altre alterazioni a carico degli organi addominali, spesso presenti in corso di ipercortisolismo quali ad esempio l'epatomegalia, la presenza di calcoli urinari o metastasi neoplastiche a carico del fegato (et al, 1990; Reusch e Feldman, 1991; e Reusch, 1999). Tale tecnica di diagnostica per immagini permette, inoltre, di aiutare il clinico nel differenziare forme di PDH da forme di ADH (Peterson, 2007; Benchekroun et al, 2010).

In circa il 97% dei casi di PDH, la forma, i contorni, l'ecogenicità e l'ecostruttura delle

ghiandole surrenali appaiono normali all'esame ecografico, tuttavia con un aumento simmetrico delle dimensioni. In corso di ADH, invece, l'ecogenicità della surrenale colpita dalla neoplasia appare variabile ed eterogenea, con distorsione dei contorni e un aumento irregolare delle dimensioni (Grooters et al., 1996), la surrenale controlaterale, invece, può apparire atrofica o normale (Hoerauf e Reusch, 1999). È importante ricordare che esiste un 10% di casi in cui il tumore può coinvolgere entrambe le surrenali (Hoerauf e Reusch, 1999), in tal caso entrambe le ghiandole appariranno aumentate nelle loro dimensioni e con ecostruttura ed ecogenicità alterate.

4.2.5.7 Tomografia computerizzata

La tomografia computerizzata (TC) può essere sfruttata per evidenziare anomalie sia a carico dell'ipofisi che delle surrenali. I soggetti affetti da PDH sono i migliori candidati per questo tipo di esame il quale deve essere effettuato come ultimo "step" dell'iter diagnostico. La TC permette infatti di visualizzare macroadenomi a carico dell'ipofisi, un esito negativo permette, invece, di emettere la diagnosi di microadenoma ipofisario con una buona certezza (Feldman e Nelson, 2004).

4.2.6 TERAPIA

Dopo la diagnosi di ipercortisolismo, occorre valutare l'approccio terapeutico migliore per il paziente. Attualmente, in Medicina Veterinaria, esistono due tipi di opzioni, la terapia di tipo medico e quella di tipo chirurgico; in entrambi i casi è fondamentale informare il proprietario dei rischi e dei benefici del trattamento scelto.

4.2.6.1 Terapia del Pituitary -Dependent Hyperadrenocorticism (PDH)

Idealmente, il trattamento del PDH dovrebbe essere volto ad eliminare la causa di tale condizione. In Medicina Umana, infatti, la rimozione **chirurgica** dell'ipofisi con un approccio transfenoidale è considerato il trattamento di elezione in corso di tumori pituitari (Mampalam et al., 1988). Anche in Medicina Veterinaria, tale tipo di intervento è stato effettuato con successo nel cane (Lantz et al., 1988; Niebauer e Evans, 1988; Niebauer et al., 1990; Meij et al., 1998) e, secondo alcuni Autori, è il metodo di elezione per il trattamento del PDH canino (Meij et al., 1998). Tuttavia, l'ipofisectomia transfenoidale richiede competenze chirurgiche considerevoli, pertanto ci si avvale, nella maggior parte dei casi, del trattamento di tipo **medico**. Tale terapia prevede la somministrazione di principi attivi quali il mitotano, il ketoconazolo o il trilostano.

Il mitotano è un derivato chimico del DDT scoperto per la prima volta da Nelson e Woodard nel 1949; è un potente adrenocorticolitico e causa una necrosi progressiva della zona fascicolata, reticolare e glomerulosa della corticale delle surrenali (Kirk e Jensen, 1975). In Medicina Veterinaria ha fornito, negli anni, risultati soddisfacenti comportando la risoluzione dei segni clinici nel 70-86% dei soggetti (Reine, 2007).

Il ketoconazolo è un derivato dell'imidazolo ed è un antimicotico (Vanden Bossche et al., 1990), tuttavia, ad elevate dosi, il ketoconazolo ha effetti anche sulla biosintesi degli steroidi, determinando una soppressione della secrezione del cortisolo. L'elevato costo del farmaco, l'inefficacia evidenziata nel 20-25% dei soggetti e la necessità di doverlo somministrare due volte al giorno ha limitato l'utilizzo di tale molecola nel trattamento dell'ipercortisolismo.

Il trilostano è un inibitore competitivo del 3 β -idrossisteroide-deidrogenasi/sistema isomerasi (3 β -HSD). Questo sistema enzimatico è essenziale per la sintesi di diversi steroidi, inclusi il cortisolo e l'aldosterone (Ramsey, 2010). Questo enzima nello specifico media la conversione del pregnenolone a progesterone e del 17-

idrossipregnenolone a 17-idrossiprogesterone. Il cortisolo, l'aldosterone e l'androsteneidione sono prodotti a partire dal progesterone e dal 17-idrossipregnenolone. Il trilostano inibisce la produzione di progesterone e di 17-idrossiprogesterone, con conseguente riduzione della sintesi dei vari steroidi prodotti dalle surrenali, dalle gonadi e dalla placenta (Potts et al., 1978). L'inibizione della steroidogenesi delle surrenali si manifesta a dosi inferiori rispetto a quelle necessarie ad inibire la sintesi di steroidi negli altri organi. L'utilizzo del trilostano in Medicina Umana ha dato risultati molto variabili e attualmente non costituisce un'opzione terapeutica nei soggetti affetti da ipercortisolismo (Biller et al, 2008). In Medicina Veterinaria, invece, sono stati effettuati diversi studi che hanno evidenziato un significativo miglioramento dei segni clinici in cani affetti da ipercortisolismo sottoposti a terapia con trilostano (Hurley et al., 1998; Neiger et al., 2002), nonostante siano state segnalate risposte variabili nei diversi soggetti (Neiger e Hurley, 2001). Il trilostano quindi si è dimostrato un farmaco efficace e sicuro nel trattamento del PDH nel cane (Ruckstuhl et al., 2002; Neiger et al., 2002).

Le indicazioni attuali sono di iniziare il trattamento con una dose di 2-5 mg/Kg/die. La somministrazione del farmaco può essere effettuata una o due volte al giorno. Ad oggi non ci sono studi che comparano direttamente le due modalità di frequenza di somministrazione (Ramsey, 2010), tuttavia è dimostrato che, nella maggior parte dei casi, l'effetto del trilostano risulta di durata inferiore alle 24 ore e che alcuni soggetti sottoposti a terapia con trilostano una volta al giorno e con uno scarso controllo dei segni clinici hanno mostrato un miglioramento clinico con la somministrazione del farmaco due volte al giorno (Bell et al, 2006). Le visite di controllo devono essere effettuate a 1, 3, 6 e 13 settimane dall'inizio della terapia e i controlli successivi sono consigliati dopo 6 e 12 mesi. Ogni visita di controllo deve comprendere la raccolta dei dati anamnestici riferiti dal proprietario, la visita clinica e il test di stimolazione con ACTH, il quale deve essere effettuato a 2-3 ore dalla somministrazione del farmaco. Il cortisolo ematico post stimolazione deve mantenersi tra 1.4 e 5.4 µg/dl (Vetoryl® Consensus Meeting; Amsterdam 19 Aprile 2006).

L'acido retinoico (9-cis isotretinoina) a dosaggi di 2 mg/Kg/die è stato recentemente studiato come molecola per il trattamento del PDH nel cane (Castillo et al, 2006; Castillo et al, 2009) e si è dimostrato efficace nel controllo della patologia. L'acido retinoico inibisce la sintesi di pro-opiomelanocortina (POMC) e, di conseguenza, inibisce anche l'ACTH, inducendo l'apoptosi della neoplasia con conseguente riduzione delle sue dimensioni (Kang, 2000; Pareda et al, 2001; Merino e Hurlé, 2003). I cani trattati con l'acido retinoico hanno mostrato un miglioramento della sintomatologia clinica con scomparsa della poliuria/polidipsia, polifagia, diminuzione del peso e delle dimensioni dell'addome, miglioramento della cute e regolarizzazione del ciclo estrale nelle femmine (Castillo et al, 2009).

Il L-Deprenyl (Anipryl®) è un inibitore reversibile e selettivo della monoaminoossidasi tipo B ed è stato studiato come potenziale farmaco per il trattamento del PDH (Bruyette et al, 1997; Peterson, 1999; Reush et al, 1999). I risultati emersi dagli studi effettuati sono discordanti e la reale efficacia del farmaco sembra inferiore a quella del mitotano e del trilostano (Reush et al, 1999).

4.2.6.2 Terapia dell'ADH

In corso di ADH è possibile procedere con il trattamento di tipo chirurgico, effettuando quindi una surrenalectomia della ghiandola colpita dalla neoplasia. Tuttavia, prima dell'intervento, è indispensabile valutare se il soggetto è un buon candidato per la chirurgia. È importante valutare la pressione arteriosa, l'ipercortisolismo, infatti, determina ipertensione nel 50-86% dei soggetti (Nichols, 1990; Ortega et al, 1996) e il rapporto proteine urinarie/creatinina. Un marcato aumento di tali parametri potrebbe indicare un elevato rischio di tromboembolismo (Ortega et al., 1996; Jacoby et al., 2001). Per lo stesso motivo è consigliabile assicurarsi che la concentrazione sierica dell'antitrombina III non sia inferiore alla norma (Feldman e Nelson, 2004). Nel caso in

cui il soggetto sia particolarmente debilitato e/o presenti problemi concomitanti all'ipercortisolismo è consigliabile posticipare l'intervento, trattare il soggetto con trilostano per 1-3 mesi e stabilizzare il paziente.

Durante l'intervento chirurgico e nelle prime sei ore del post-operatorio è indispensabile supplementare il soggetto con 0,05-0,1 mg/Kg di desametasone per via endovenosa. Lo stesso dosaggio deve essere ripetuto 2 o più volte durante la giornata dell'intervento. Nei giorni seguenti lo stesso dosaggio deve essere somministrato BID o TID per via sottocutanea fino a quando il soggetto non possa essere sottoposto ad una somministrazione per via orale senza rischio di vomito (Feldman e Nelson, 2004).

Il trattamento di tipo chirurgico è sconsigliato nel caso in cui la diagnostica per immagini abbia evidenziato una massa neoplastica palesemente inoperabile o la presenza di metastasi a carico di altri organi. Tuttavia, in questi soggetti è possibile procedere con la terapia medica descritta precedentemente.

4.3 IPERCORTISOLISMO IATROGENO

I corticosteroidi sono ampiamente utilizzati nella pratica clinica Veterinaria, talvolta anche in modo inappropriato, gli effetti che posseggono sono numerosi e non tutti sono ancora stati descritti nei loro meccanismi più profondi. Le alterazioni cliniche ed ematobiochimiche che possono scatenare sono sovrapponibili a quelle precedentemente descritte riguardo l'ipercortisolismo spontaneo, tuttavia la somministrazione di corticosteroidi esogeni causa anche una rapida e prolungata soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. In dipendenza del dosaggio e della attività intrinseca glucocorticoidea, del protocollo e della durata di somministrazione e della preparazione o formulazione della molecola somministrata, tale soppressione può durare per settimane o mesi dopo la sospensione del trattamento (Kooistra e Galac, 2010).

4.3.1 MECCANISMI D'AZIONE

La miriade di effetti fisiologici dei glucocorticoidi risulta dall'interazione del farmaco con i recettori glucocorticoidei, alcune attività possono, tuttavia, essere mediate da meccanismi non recettoriali (Norman et al, 2004). Sono stati identificati almeno 3 differenti tipi di recettori, ognuno con diverso effetto fisiologico (Funder, 1992). Esistono differenze tra i vari tessuti negli alfa- e beta- recettori glucocorticoidei, nel rapporto e nella concentrazione di RNA, suggerendo che esiste una regolazione genica da parte dei glucocorticoidi nelle differenti cellule (Korn, 1998). Nonostante sembri che tutti i tipi di cellule posseggano recettori glucocorticoidei, il fegato risulta il target primario. Il tipo e la concentrazione di recettori varia da specie a specie, nei vari tessuti e, in uno stesso tessuto, il numero di recettori può fluttuare con il ciclo e l'età cellulare e in risposta ad una varietà di sostanze esogene o endogene. Sono stati identificati più di 15 regolatori endogeni dei recettori glucocorticoidei (Burnstein e Cidlowski, 1992).

I recettori glucocorticoidei sono localizzati nel citoplasma delle cellule target associati alle proteine dello “shock termico” e ad una immunofilina, una proteina intracellulare che lega altre sostanze immunosoppressive (Shimmer e Parker, 1995). Il recettore rimane inattivo fino a quando non viene legato ad un ligando steroideo (Shimmer e Parker, 1995). Gli steroidi entrano nelle cellule attraverso una diffusione passiva, tuttavia potrebbe esistere anche un meccanismo di trasporto attivo velocità-limitato. Una volta all'interno della cellula, il glucocorticoide si lega al recettore, le proteine dello shock termico e la immunofilina si dissociano e ne risulta un complesso attivato glucocorticoide-recettore che viene traslocato al nucleo cellulare (Hayashi et al, 2004) . All'interno del nucleo il complesso si lega come dimero agli elementi responsivi ai glucocorticoidi ed interagisce con i complessi coattivatori. I glucocorticoidi quindi producono i loro effetti sulle cellule attivando i recettori glucocorticoidei e regolando

quindi, direttamente o indirettamente la trascrizione dei geni target (Hayashi et al, 2004). La trascrizione del gene e la conseguente formazione delle relative proteine può essere inibita o indotta (Tabella 4.1).

| Aumento della trascrizione | Inibizione della trascrizione |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Lipocortina-1 • β 2-Adrenorecettore • Proteina inibitoria dei leucociti secretori (SLPI) • Antagonista dell'IL-1 recettore • Enzima angiotensina-converting • Endopetidasi neutrale • β 2-Adrenorecettore • Na K ATPasi (mineralcorticoidi) | <ul style="list-style-type: none"> • Chemochine • Citochine (IL -1 -2 -3 -4 -5 -6 -9 -11 -12 -13 -16 -17 -18 - TNFα) • Recettori natural killer1 • Sintasi inducibile ossido nitrico • Cicloossigenasi • Endotelina1 • Fosfolipasi2 • Collagenasi • Stromelisina |

Tabella 4.1: esempi di proteine la cui sintesi è soggetta alla regolazione dei recettori glucocorticoidei (Modificato da Hayashi et al, 2004).

Le proteine decodificate da questi geni sono responsabili dei fisiologici/farmacologici effetti dei glucocorticoidi. La vita media cellulare del complesso attivato è di circa 10 ore (Bodine e Litwack, 1990) dopodiché i recettori ed i glucocorticoidi vengono metabolizzati con meccanismi e tempistiche ancora non ben chiari (Boothe e Mealey, 2001). Non si conosce, infatti, se la velocità di metabolismo del complesso recettore-glucocorticoidi sia dipendente dallo specifico corticosteroide coinvolto.

In generale, i recettori mineralcorticoidei agiscono in modo simile a quelli glucocorticoidei e possono essere strutturalmente identici (Schimmer e Parker, 1995). La differenza di azione di questi due tipi di steroidi riflette in parte le differenti abilità di attivare distinti gruppi di geni target. Inoltre i recettori mineralcorticoidei hanno una espressione ridotta, con il principale sito rappresentato dai tubuli corticali distali e tubuli collettori, il colon, le ghiandole salivari e sudoripare e l'ippocampo (Boothe e Mealey, 2001). Le differenze negli effetti degli steroidi sono in parte indipendenti dall'interazione recettoriali, il metabolismo dei differenti steroidi da parte degli enzimi

localizzati nei tessuti steroideo-responsivi, infatti, sembra fornire una barriera enzimatica inattivando gli steroidi ai quali il tessuto non deve rispondere (Boothe e Mealey, 2001).

4.3.2 EFFETTI FISIOLOGICI

I glucocorticoidi sono ben conosciuti per i loro potenti effetti antiinfiammatori, tuttavia posseggono numerose altre funzioni, alcune delle quali sono vitali per la sopravvivenza dell'organismo.

4.3.2.1 Effetti sul metabolismo intermedio: carboidrati, proteine e lipidi

Una delle funzioni dei glucocorticoidi è quella di proteggere le funzioni cerebrali glucosio-dipendenti, stimolando la formazione di glucosio da parte del fegato, diminuendo la sua utilizzazione periferica e promuovendo lo stoccaggio di glicogeno (Haynes, 1990); tali effetti proteggono i tessuti glucosio-dipendenti quali l'encefalo e il cuore dalla potenziale ipoglicemia in seguito al digiuno (Schimmer e Parker, 1995). Gli effetti iperglicemici dei glucocorticoidi sono dovuti ad un aumento della gluconeogenesi e all'antagonismo con l'insulina. La gluconeogenesi è il risultato di un aumento dei precursori ad essa necessari e di un'induzione degli enzimi epatici che catalizzano le reazioni di sintesi del glucosio. Una aumentata proteolisi, soprattutto del muscolo scheletrico e del collagene, fornisce precursori gluconeogenici come ad esempio aminoacidi e glicerolo. Tale effetto si manifesta clinicamente come debolezza muscolare, ritardo della cicatrizzazione ed assottigliamento della cute. Gli effetti anti-insulinici dei glucocorticoidi sono il risultato di una diminuita utilizzazione di glucosio nei tessuti periferici ed una diminuita affinità dei recettori cellulari per l'insulina. La minor utilizzazione sembra causata da una traslocazione dei recettori insulinici dalla

membrana cellulare ad una localizzazione intracellulare inaccessibile per l'insulina (Schimmer e Parker, 1995).

Anche il metabolismo dei lipidi risulta fortemente influenzato dai glucocorticoidi i quali, nello specifico, promuovono la lipolisi generando acidi grassi liberi che, insieme agli aminoacidi, servono come substrato per la sintesi epatica di glicogeno ed inibiscono la sintesi di acidi grassi a lunga catena. Gli effetti dei glucocorticoidi sul metabolismo dei lipidi riflettono in parte un effetto permissivo degli steroidi su altri agenti, come il growth hormone (GH) e i recettori β -adrenergici. Sulla sequela di questi effetti si ha una redistribuzione dei grassi corporei la quale si manifesta con il classico “aspetto cushingoide” (Boothe e Mealey, 2001).

4.3.2.2 Equilibrio idrico ed elettrolitico

I mineralcorticoidi agiscono promuovendo il riassorbimento di sodio in cambio del potassio nei tubuli distali e collettori renali, o degli idrogeno-ioni nelle cellule intercalate promuovendo un bilancio sodico positivo, l'espansione del volume fluido extracellulare e l'aumento del grado di filtrazione glomerulare. Il riassorbimento di Sodio è promosso dall'aumento del numero di canali Na^+ e K^+ aperti; inoltre, l'attività $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPasi nella membrana basolaterale risulta aumentata causando il ritorno di sodio nella circolazione sanguigna.

Gli effetti dei mineralcorticoidi non sono limitati al tessuto renale ma coinvolgono anche il colon, l'ileo, l'apparato ciliare, le ghiandole salivari e, nell'uomo, anche quelle sudoripare e sono responsabili dell'equilibrio idrico ed elettrolitico. Il cortisolo endogeno ed i glucocorticoidi sintetici posseggono vari gradi di attività mineralcorticoidea che, tuttavia, risulta meno dell'1% di quella posseduta dall'aldosterone. I glucocorticoidi esplicano anche un effetto sui meccanismi tubulari che mantengono il grado di filtrazione glomerulare; hanno un effetto inibitorio

sull'ormone antidiuretico (ADH) e possono diminuire la permeabilità all'acqua dei tubuli distali renali attraverso una azione diretta. La poliuria/polidipsia che si osserva comunemente nei cani sottoposti a terapie con corticosteroidi è il risultato della combinazione degli effetti mineral- e gluco-corticoidei.

I glucocorticoidi influenzano diversi aspetti del movimento del Calcio, nelle cellule del tubulo renale l'escrezione di calcio aumenta e, nell'intestino, il suo assorbimento risulta diminuito, si ha, inoltre, un aumento delle secrezioni di paratormone (PTH) che a sua volta aumenta il riassorbimento osseo osteoclasti-mediato. L'effetto dei glucocorticoidi sull'omeostasi del Calcio, nel complesso, è quello di diminuire le riserve di calcio totali.

4.3.2.3 Sistema emolinfatico

I glucocorticoidi tendono ad aumentare il contenuto di globuli rossi del sangue, ritardando l'eritrofagocitosi. La linfopenia e la eosinopenia dovute alla redistribuzione cellulare e la neutrofilia dovuta all'aumento del rilascio da parte del midollo osseo, alla demarginazione e alla riduzione della loro rimozione dal circolo sono tutti reperti clinico-patologici associati alla somministrazione di glucocorticoidi (Schimmer e Parker, 1995). Tale profilo delle cellule ematiche viene anche definito “leucogramma da stress” e si evidenzia, come detto in precedenza, anche nei pazienti con elevate concentrazioni di glucocorticoidi endogeni. Gli effetti acuti dei glucocorticoidi sui linfociti circolanti sono rappresentati dal sequestro dal circolo ematico piuttosto che dalla linfocitolisi.

4.3.2.4 Effetti antiinfiammatori ed immunosoppressivi

I glucocorticoidi vengono utilizzati, sia in medicina Umana che Veterinaria, per la loro azione anti-infiammatoria ed immunosoppressiva. Poiché questi due effetti riflettono specifiche azioni dei glucocorticoidi sui globuli bianchi, sono inestricabilmente collegati e si sviluppano quando le concentrazioni di steroidi risultano maggiori rispetto alle condizioni di normalità. I glucocorticoidi, oltre ad alterare il numero dei globuli bianchi, ne influenzano anche le funzioni; ne risulta influenzato, quindi, sia il sistema immunitario cellulo-mediato che quello umorale (Boothe e Mealey, 2001).

I glucocorticoidi inibiscono la fase precoce e quella ritardata dell'infiammazione. Durante queste fasi, numerose risposte vengono inibite quale, ad esempio, la formazione di edema, la deposizione di fibrina, la migrazione leucocitaria, l'attività fagocitica, la deposizione di collagene e la proliferazione di fibroblasti e capillari. Molti di questi processi coinvolgono le linfocine ed altri mediatori dell'infiammazione. Si suppone che sia su questi mediatori che i glucocorticoidi esercitano la loro azione anti-infiammatoria. Nello specifico, i glucocorticoidi inibiscono attraverso la lipocortina, l'enzima Fosfolipasi A2, il quale converte l'acido arachidonico a prostaglandine e leucotrieni. I glucocorticoidi possono inibire anche la ciclo-ossigenasi 2, la forma inducibile della ciclo-ossigenasi (Crofford et al, 1994; Ristimaki et al, 1996), ne consegue un'inibizione delle prostaglandine infiammatorie senza un impatto negativo sugli effetti protettivi delle prostaglandine in altri organi come ad esempio il rene, il tratto gastrointestinale e l'emostasi (Boothe e Mealey, 2001). Un altro effetto dei glucocorticoidi è quello di inibire il rilascio di tumor necrosis factor (TNF) e di interleuchina-2 (IL-2) da parte dei macrofagi attivati; il primo induce citotossicità e può potenziare le funzioni dei neutrofili e degli eosinofili, la seconda invece, è principalmente coinvolta nelle funzioni immunitarie. Il rilascio di fattore attivante le piastrine da parte dei leucociti e delle mast-cells viene inibito dai glucocorticoidi. Tale fattore induce vasodilatazione, aggregazione leucocitaria e piastrinica, contrazione del muscolo liscio, soprattutto nei bronchi, ed aumento della permeabilità vasale (Campbell, 1990). Anche l'azione del fattore inibente la migrazione dei macrofagi subisce un'inibizione da parte dei corticosteroidi, ne

consegue che i macrofagi si allontanano dall'area colpita dall'insulto. I glucocorticoidi alterano la sintesi e la risposta degli attivatori del collagene, lipasi e plasminogeno; inibiscono la forma inducibile della sintasi dell'ossido nitrico (iNOS) (Yang et al, 1998).

I glucocorticoidi hanno, inoltre, effetti immunosoppressivi maggiormente pronunciati sulla risposta immunitaria cellulo-mediata rispetto a quella umorale, posseggono infatti, effetti minimi sulle concentrazioni plasmatiche delle immunoglobuline ma possono modulare le loro funzioni, ad esempio inibendo l'opsonizzazione dei batteri. Le azioni immunosoppressive dei glucocorticoidi, così come quelle anti-infiammatorie, coinvolgono la rottura della comunicazione intercellulare dei leucociti interferendo con la produzione di linfocine e con le loro azioni biologiche. I glucocorticoidi bloccano gli effetti migrazione-inibizione del fattore- γ ed interferone- γ (IFN- γ) sui macrofagi (Haynes, 1990). L'IFN- γ , il quale è rilasciato dalle cellule T attivate, gioca un ruolo importante nel facilitare la processazione dell'antigene da parte dei macrofagi.

I glucocorticoidi inibiscono la sintesi ed il rilascio di IL-1 da parte dei macrofagi, in tal modo sopprimono l'attivazione delle cellule T; inibiscono anche la sintesi di IL-2 da parte delle cellule T attivate, la quale gioca un ruolo critico di amplificazione della immunità cellulo-mediata. Inoltre i glucocorticoidi sopprimono le azioni fungicide e battericide dei macrofagi. Gli effetti immunosoppressivi dei glucocorticoidi hanno potenzialmente un'influenza anche sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Numerose citochine sembrano regolare questo asse, nello specifico la IL-1 sembra stimolare il rilascio di CRH, aumentando direttamente il rilascio di ACTH e potrebbe così causare un aumento di glucocorticoidi da parte delle surrenali. Tale interazione sembra di rilevante importanza nella modulazione dello stress e nel mantenimento dell'omeostasi (Schimmer e Parker, 1995).

4.3.2.5 Sistema cardiovascolare

Oltre agli effetti nel mantenimento del volume fluido extracellulare già descritto, i mineralcorticoidi hanno anche una azione diretta sul sistema cardiovascolare caratterizzata dall'aumento della fibrosi cardiaca. I glucocorticoidi, invece promuovono la reattività vascolare alle altre sostanze vasoattive come ad esempio la norepinefrina e l'angiotensina II (Schimmer e Parker, 1995) e presumibilmente riducono l'attività dei sistemi depressori; per tale motivo i soggetti affetti da ipercortisolismo possono manifestare ipertensione.

4.3.2.6 Ossa e cartilagine

I glucocorticoidi antagonizzano gli effetti della vitamina D3 accelerando il riassorbimento di tessuto osseo e diminuendone la formazione attraverso un'azione diretta sugli osteoblasti, causando in questo modo osteoporosi. Questo fenomeno è ben documentato in Medicina Umana dopo terapie prolungate con glucocorticoidi ma non sembra descritta nei nostri animali (Boothe e Mealey, 2001). A dosaggi sovra-fisiologici, i glucocorticoidi inibiscono la sintesi di collagene da parte dei fibroblasti, deprimono il metabolismo dei condrociti e diminuiscono il contenuto di proteoglicani della cartilagine, apportando modificazioni morfologiche nelle cartilagini articolari (Adams, 1992).

4.3.2.7 Muscolo scheletrico

I glucocorticoidi influenzano l'abilità del muscolo scheletrico a funzionare normalmente. La cosiddetta “miopatia da steroidi” è caratterizzata da una importante debolezza muscolare.

4.3.2.8 Sistema nervoso centrale

Indirettamente i glucocorticoidi mantengono le adeguate concentrazioni di glucosio per le funzioni cerebrali, mantengono il flusso sanguigno cerebrale e influenzano l'equilibrio elettrolitico nel sistema nervoso centrale. I glucocorticoidi diminuiscono la formazione di liquido cerebrospinale, determinando una diminuzione della pressione intracranica.

4.3.2.9 Apparato gastroenterico

I glucocorticoidi determinano un aumento della secrezione di acido gastrico, pepsina e tripsina ed aumentano l'assorbimento di grassi a livello gastrointestinale; diminuiscono la crescita e il rinnovo delle cellule mucosali gastriche e la produzione di muco compromettendo le barriere protettive della mucosa gastrica. Tutti questi meccanismi contribuiscono all'aumento della suscettibilità alla ulcera gastrica. Non è ancora chiaro se gli effetti dei glucocorticoidi sulla mucosa gastrica siano il risultato di una diminuita sintesi di prostaglandine mucosali.

4.3.3 FARMACOCINETICA dei CORTICOSTEROIDI

In commercio esistono numerose preparazioni farmaceutiche a base di corticosteroidi approvate per l'utilizzo in Medicina Umana e in Medicina Veterinaria. Tali farmaci differiscono tra loro primariamente per la durata d'azione, l'attività mineralcorticoidea e la potenza d'azione antiinfiammatoria.

4.3.3.1 Distribuzione e metabolismo

Nell'uomo e, si suppone, anche in molte specie animali il cortisolo endogeno e quello esogeno si legano ad una globulina legante i corticosteroidi, la transcortina, la quale viene secreta dal fegato. Nonostante essa abbia un'alta affinità per gli steroidi, ha una relativamente scarsa capacità legante. Le albumine, invece, posseggono una scarsa affinità ma una più marcata capacità legante. I corticosteroidi esogeni ed endogeni competono tra loro per legarsi ai siti specifici e alte concentrazioni dei primi permettono di spiazzare i secondi.

Gli ormoni steroidei tendono ad essere eliminati attraverso l'ossidazione o la riduzione seguita dalla coniugazione e dalla escrezione, prevalentemente renale. Il metabolismo si verifica in siti sia intraepatici che extraepatici come ad esempio il rene; l'eliminazione biliare e fecale non sembra essere rilevante (Schimmer e Parker, 1995).

4.3.3.2 Preparazioni farmaceutiche

Idrocortisone: è identico al cortisolo endogeno. Poiché possiede una corta durata d'azione, inferiore alle 12 ore, ed una scarsa potenza, non è frequentemente utilizzato per le terapie sistemiche.

Prednisolone e Prednisone: il prednisone viene rapidamente metabolizzato dal fegato a prednisolone. Patologie epatiche possono avere un minimo effetto sulla attivazione. Il prednisolone ha una durata d'azione di 12-36 ore.

Metilprednisolone: possiede attività glucocorticoide 4-5 volte più potente dell'idrocortisone e non possiede attività mineralcorticoidea apprezzabile. Ha una durata d'azione di 12-36 ore.

Desametasone: è un potentissimo glucocorticoide, tuttavia non possiede alcuna attività mineralcorticoidea, ha una prolungata durata d'azione con un'emivita che può raggiungere le 48 ore.

Fludrocortisone: è un ormone steroideo sintetico con sola attività mineralcorticoide.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 5

MATERIALI e METODI

5.1 INTRODUZIONE

Questo studio, in parte retrospettivo ed in parte prospettivo, è stato condotto valutando i casi clinici di cani afferiti alla sezione di Medicina Interna del Dipartimento Clinico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria Alma Mater Studiorum Università di Bologna, nel periodo compreso fra il 1.1.2000 e il 31.12.2010.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare le concentrazioni ematiche di alcune APPs in cani affetti da ipercortisolismo spontaneo (Gruppo 1) e in cani con differenti patologie (Gruppo2); è stato inoltre selezionato un gruppo di controllo di cani sani (Gruppo 3). Le determinazioni sono state effettuate su campioni stoccati di plasma e siero prelevati dalla vena cefalica dell'avambraccio o dalla vena giugulare di 44 cani adulti di differenti razze e sesso affetti da ipercortisolismo spontaneo e 22 affetti da differenti patologie su base infettiva, infiammatoria, immunomediata o neoplastica. In ciascun soggetto dei differenti gruppi sono stati utilizzati i campioni ottenuti all'ammissione prima che venisse instaurata una terapia specifica e su di essi sono state misurate le concentrazioni di 2 APPs: Hp e CRP. In alcuni soggetti affetti da

ipercortisolismo spontaneo la CRP e la Hp sono state misurate anche dopo circa 10-20 e 30-60 giorni dall'inizio della terapia con trilostano. In alcuni cani del gruppo 2 le concentrazioni di CRP e Hp sono state rivalutate dopo l'inizio di una terapia con corticosteroidi esogeni.

5.2 MATERIALI e METODI

5.2.1 SELEZIONE DEI SOGGETTI CON IPERCORTISOLISMO SPONTANEO

I soggetti affetti da ipercortisolismo sono stati identificati valutando le cartelle cliniche dei pazienti afferiti al Dipartimento Clinico Veterinario nel periodo compreso fra Gennaio 2000 a Dicembre 2008. Tali cani sono stati inclusi nello studio qualora presentassero i segni clinici, i rilievi ecografici dell'addome e i risultati clinico-patologici compatibili con ipercortisolismo spontaneo.

La diagnosi di ipercortisolismo è stata effettuata in tutti i cani in base all'anamnesi, alla visita clinica, a un esame emocromocitometrico, a un profilo biochimico completo, a un esame chimico-fisico delle urine e a valutazioni diagnostiche specifiche quali il test di stimolazione con ACTH, il test di soppressione con desametasone a basse dosi (LDDSt) (effettuato in 32 soggetti), il test di soppressione con desametasone ad alte dosi valutando l'UC:CR a livello urinario (effettuato in 2 soggetti) e la valutazione ecografica delle ghiandole surrenali (effettuata in 35 soggetti). Sono stati inclusi nello studio i soggetti che presentavano alterate almeno due delle tre valutazioni diagnostiche specifiche sopra elencate. La diagnosi di sede (PDH o ADH) è stata effettuata tramite ecografia delle surrenali e i risultati del LDDSt.

Il test di stimolazione con ACTH è stato condotto valutando la cortisolemia sierica

prima e 1 ora dopo la somministrazione endovenosa di 0,25 mg di tetracosactide esacetato (Synacthen®, Novartis); tale test è stato considerato positivo nel caso in cui la cortisolemia post-ACTH risultasse maggiore di 18 µg/dl.

Il LDDSt è stato eseguito misurando la cortisolemia sierica prima e dopo 4 e 8 ore dalla somministrazione endovenosa di 0,01 mg/Kg di desametasone (Dexadreson®, Intervet); tale test è stato considerato indicativo di ipercortisolismo nel caso in cui il cortisolo a 8 ore dalla somministrazione di desametasone fosse maggiore di 1,4 µg/dl e indicativo di PDH nel caso in cui il cortisolo a 4 ore dalla somministrazione del desametasone fosse inferiore a 1,4 µg/dl o inferiore più del 50% rispetto al valore basale.

La cortisolemia è stata misurata con una metodica immunologica di tipo competitivo validata per la specie canina (Reimers et al, 1996) (Immulite® Cortisol, Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, USA).

Le valutazioni morfometriche e morfologiche delle ghiandole surrenali sono state attuate secondo le modalità descritte in letteratura (Reusch, 2005).

Il test UC:CR con desametasone ad alte dosi è stato effettuato prelevando le urine per caduta per 2 mattine consecutive e somministrando, per tre volte a distanza di 8 ore, 0,1 mg/Kg di desametasone per bocca dopo il secondo prelievo di urine. Un terzo campione di urine è stato prelevato dopo 8 ore dalla terza somministrazione di desametasone. Sui tre campioni di urine è stato valutato l'UC:CR. Tale test è stato considerato indicativo di PDH qualora l'UC:CR del terzo campione risultasse inferiore più del 50% rispetto al valore medio dell'UC:CR dei primi due campioni.

Il trilostano (Vetoryl®) è stato somministrato per bocca al mattino con il pasto. La dose iniziale è stata di 2-5 mg/Kg somministrati una volta al giorno. Per il monitoraggio della terapia, il test di stimolazione con ACTH è stato effettuato a 2-4 ore dalla somministrazione del farmaco. In tutti i soggetti il primo controllo per il monitoraggio terapeutico è avvenuto a circa 10 giorni (9-16 giorni) dall'inizio terapia ed il secondo controllo è stato eseguito a circa 30 giorni (30-55 giorni) dall'inizio della terapia. La dose è stata successivamente aumentata, diminuita o non modificata in base alla risposta

terapeutica e al test di stimolazione con ACTH considerando ottimale un valore di cortisolemia post stimolazione compreso fra 1 e 5 µg/dl. Le variazioni di dosaggio sono state di 10, 30 o 60 mg a seconda del peso del soggetto e in alcuni soggetti si è resa necessaria la somministrazione di trilostano due volte al giorno.

Tutti i soggetti non erano stati precedentemente sottoposti a terapia nei confronti dell'ipercortisolismo spontaneo.

5.2.2 SELEZIONE DEI SOGGETTI AFFETTI DA ALTRE PATOLOGIE

I cani inclusi nel gruppo 2 sono soggetti di età, sesso, razza e taglia variabili afferiti presso il dipartimento Clinico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria Alma Mater Studiorum Università di Bologna, nel periodo compreso fra il 01.11.2004 e il 10.08.2010. I cani sono stati inclusi nello studio qualora presentassero una patologia di differente natura e nei quali fossero state misurate le concentrazioni di CRP ed eventualmente anche di Hp al momento dell'ammissione, prima che venisse instaurata una terapia specifica. Qualora la patologia diagnosticata richiedesse un trattamento con corticosteroidi e qualora fossero sottoposti a tale terapia per più di una somministrazione, è stata valutata la concentrazione di CRP e Hp dopo 1-30 giorni dall'inizio della terapia, a seconda della scelta del clinico. Ogni soggetto è stato sottoposto ad un protocollo terapeutico differente pertanto il tipo di glucocorticoide, il dosaggio e la durata del trattamento variano da soggetto a soggetto.

5.2.3 SELEZIONE DEI SOGGETTI SANI

Per il gruppo di controllo, sono stati selezionati cani di età e razza variabile afferiti presso il dipartimento Clinico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria Alma Mater Studiorum Università di Bologna nel periodo compreso da Gennaio 2004 a Febbraio 2009 per visite di routine o per richiami vaccinali. Tali soggetti sono stati considerati sani e quindi inclusi nel gruppo di controllo (Gruppo3) sulla base dell'anamnesi, della visita clinica, dell'esame emocromocitometrico, del profilo biochimico e dell'esame chimico-fisico delle urine.

5.2.4 COLLEZIONE E STOCCAGGIO DEI CAMPIONI

I prelievi sono stati effettuati con butterfly o siringhe con aghi da 22G dalla vena cefalica dell'avambraccio o dalla vena giugulare. Il sangue è stato raccolto in provette senza anticoagulante per ottenere il siero, con sodio citrato o con EDTA per ottenere il plasma. I campioni in provette senza anticoagulante sono state poste a sierare a 37°C per 15-20 minuti e poi centrifugate per 10 minuti. Il plasma e il siero sono poi stati raccolti in cuvette e congelate a -20°C. Le determinazioni delle concentrazioni delle APPs dei singoli gruppi sono state effettuate simultaneamente.

5.3 DETERMINAZIONI DELLE APPs

In tutti i soggetti con ipercortisolismo spontaneo sono state misurate la CRP e la Hp sui campioni ematici stoccati al momento della diagnosi. In alcuni cani con ipercortisolismo spontaneo la CRP e l'Hp sono state valutate anche a circa 10-20 e 30-60 giorni dall'inizio della terapia con trilostano.

Nei cani con differenti patologie (Gruppo 2) la CRP (misurata in 22/22 soggetti) e l'Hp (misurata in 18/22 soggetti) sono state valutate sui campioni ematici stoccati al momento della diagnosi della patologia in atto. Dei soggetti che in seguito alla diagnosi

sono stati sottoposti a terapia con corticosteroidi, la CRP e l'Hp sono state valutate su campioni prelevati in un periodo di tempo variabile di 1-30 giorni dopo l'inizio della terapia.

5.3.1 PROTEINA C-REATTIVA (CRP)

Per valutare la concentrazione di Proteina C-Reattiva sierica, è stato utilizzato un metodo immunoturbidimetrico (Olympus System Reagent C-REACTIVE PROTEIN OSR 6147).

Reagenti e calibrazione:

| | | |
|-------------------------|--|--|
| Reagente R1 | Tampone Tris (Idrossimetil) aminometano (pH 7,5) 80 mmol/l | Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg |
| Reagente R2 | Sodio cloruro 125 mmol/l Polietilenglicole 6000 1,5 % w/v Anticorpo Anti-CRP umana da capra Conservante (sodio azide) | Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg |
| Multicalibratore | Siero Proteine 1 OLYMPUS Cat.No. ODR3021 | Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg |
| Controllo | controllo Olympus per Immunoturbidimetria Cat.-No ODC0014, ODC0015 e ODC0016 | Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg |

Tabella 5.1: reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la CRP.

Principio del metodo: quando il campione viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, la Proteina C Reattiva reagisce in modo specifico con anticorpi anti-CRP dando origine ad aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di CRP nel campione.

Linearità: il metodo lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo di 5-200 mg/l.

Interferenze:

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

Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 500 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 10%;

Lipidi: concentrazioni di lipidi aggiunti di 1000 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 20%.

5.3.2 APTOGLOBINA (Hp)

Per la determinazione dell'aptoglobina sierica, questa sperimentazione si è avvalsa di un metodo immunoturbidimetrico a punto finale (HAPTOGLOBIN OSR 6165, Olympus System Reagent).

Reagenti e calibrazione:

| | | |
|--------------------|--|--|
| Reagente R1 | Tampone Tris (PH 7,6) 78 mmol/l | Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg |
| Reagente R2 | Anticorpo Anti-Aptoglobina umana da capra Conservante | Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg |
| | | |

| | | |
|-------------------------|---|--|
| Multicalibratore | Siero Proteine 2 OLYMPUS Cat.No. ODR3023 | Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg |
| Controllo | controllo Olympus per Immunoturbidimetria ODC0014, ODC0015 e ODC0016 | Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg |

Tabella 5.2: reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'Aptoglobina.

Principio del metodo: quando il campione viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, la Hp reagisce in modo specifico con anticorpi anti-Hp dando origine ad aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione dell'aptoglobina nel campione.

Linearità: il metodo è lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo di 30-400 mg/dl. Il test ha una tolleranza riguardo l'effetto prozona di 800 mg/dl.

Stabilità dei reagenti: i reagenti (R1 e R2) sono pronti all'uso e possono essere posti direttamente sullo strumento. I reagenti sono stabili, se non aperti e conservati a 2-8°C, fino alla data di scadenza. I reagenti una volta aperti e posti nello strumento, sono stabili 60 giorni.

Interferenze:

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

Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 500 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 10%;

Lipidi: concentrazioni di lipidi aggiunti di 1000 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 20%.

| APPs | Valori di riferimento |
|------|-----------------------|
| CRP | 0 – 0,5 mg/dl |
| Hp | 20 – 140 mg/dl |

Tabella 5.3: valori di riferimento di CRP e Hp stabiliti dal nostro laboratorio in base alle determinazioni su un gruppo di cani sani (dati non riportati).

5.4 ANALISI STATISTICA

Per l'elaborazione dei dati rilevati in questo lavoro sperimentale sono stati utilizzati i Software:

- statistica 4.5, Statsoft, Inc. 1993;
- MedCalc, Statistical Software vsn 7.2.0.2;
- Analyse-it™ “General and Clinical Laboratory Statistics” vsn 1.71, Analyse-it Software, Ltd.

I test utilizzati per l'analisi statistica dei dati sono:

- Mann-Whitney test
- Wilcoxon matched test
- Test t-student per dati accoppiati e non accoppiati

CAPITOLO 6

Risultati

6.1 IPERCORTISOLISMO SPONTANEO (Gruppo 1)

I soggetti che hanno soddisfatto i criteri di inclusione del gruppo 1 sono stati 44 cani di età compresa fra i 5 e i 16 anni (Media $9,5 \pm 2,74$) di cui 23 femmine (7 sterilizzate) e 21 maschi (4 castrati); 12 soggetti erano meticci, 8 Boxer, 5 Yorkshire terrier, 2 Siberian Husky, 2 Bassotto, 2 Barbone nano e 13 cani erano di altre razze rappresentate da un solo soggetto (Tabella 6.1). Per quanto concerne il peso questo era compreso tra i 4 e i 55 Kg (Media $16,2 \pm 12,6$).

All'anamnesi 39/44 soggetti presentavano poliuria e polidipsia (88,6%), 28/44 polifagia (63,6%). Alla visita clinica 28/44 cani presentavano aree di alopecia o di rarefazione del pelo (63,6%) e 25/44 addome a botte (58,8%). In tabella 6.1 vengono riportati i dati relativi ai soggetti affetti da ipercortisolismo spontaneo: età, razza, sesso, diagnosi e concentrazioni ematiche di CRP e Hp al momento dell'ammissione. 4 soggetti (n°5, 8, 30 e 39) si sono rivelati, al momento della diagnosi di ipercortisolismo, affetti da concomitante diabete mellito.

All'esame emocromocitometrico, solo il soggetto n° 26 e il n° 31 (4,6%) presentavano un livello di leucociti superiore ai limiti di riferimento. All'esame ematobiochimico 38/44 soggetti (86,4%) presentavano valori di fosfatasi alcalina superiore ai limiti di riferimento, di cui 28/44 superiore a 500 U/L (63,6%). All'esame chimico-fisico delle urine è stato rilevato un peso specifico (PS) che oscillava da 1002 a 1056 (mediana

1012,36). Il test di stimolazione con ACTH è risultato indicativo di ipercortisolismo in 37 dei 44 soggetti (84,1 %). In 6 cani (n°6, 7, 9, 17, 20, 21) il test di stimolazione con ACTH è risultato nei limiti della norma.

In tutti i soggetti su cui è stato effettuato il LDDSt (32/44), il cortisolo a 8 ore è risultato sempre superiore a 1,4 µg/dl, tranne in 6 soggetti (n° 11, 13, 30, 34, 38 e 41).

Dei 35/44 cani su cui è stata eseguita un'ecografia addominale, 25/35 presentavano un'iperplasia surrenalica bilaterale, sei soggetti/35 (n° 4, 7, 21, 27, 33 e 41) sono risultati affetti da ipercortisolismo di origine surrenalica, di cui 2 (n°7 e 33) mostravano un'iperplasia della surrenale controlaterale, altri 2 soggetti (n° 21 e 41) presentavano surrenale controlaterale normale e in un cane (n° 27) non è stato possibile visualizzarla. Quattro soggetti/35 (11,4%) (n° 9, 23, 28 e 40) hanno mostrato all'esame ecografico surrenali di morfologia e volume nei limiti della norma.

| N° | ETA' | RAZZA | SESSO | DIAGNOSI | CRP (mg/dl) | Hp (mg/dl) |
|----|-----------|-------------------|-------|----------|-------------|------------|
| 1 | 7a | Boxer | F | PDH | 0,86 | 0 |
| 2 | 16a | Meticcio | F | PDH | 0,01 | 153 |
| 3 | 12a | Beagle | M | PDH | 0,01 | 106 |
| 4 | 16a 2m | Meticcio | F | ADH | 0,01 | 282 |
| 5 | 9a 6m | Bolognese | M | PDH | 0,01 | 191 |
| 6 | 7 a 3 m | Boxer | F | PDH | 0,01 | 273 |
| 7 | 12a | Schnauzer nano | S | ADH | 0,01 | 132 |
| 8 | 12a | Husky | S | PDH | 1,54 | 224 |
| 9 | 8a | Boxer | M | PDH | 0,01 | 202 |
| 10 | 9a | Fox Terrier | M | PDH | 0,01 | 140 |
| 11 | 9a | Meticcio | F | PDH | 0,01 | 249 |
| 12 | 14 a 2 m | Meticcio | C | PDH | 0,01 | 390 |
| 13 | 11a | Shih-tzu | S | PDH | 0,02 | 94 |
| 14 | 13 a | Bracco Ungherese | C | PDH | 0,01 | 324 |
| 15 | 10a | Meticcio | M | PDH | 0,01 | 495 |
| 16 | 6a | Meticcio | S | PDH | 0,01 | 392 |
| 17 | 6a | Yorkshire Terrier | F | PDH | 1,63 | 315 |
| 18 | 7 a 9 m | Coton de Toulear | M | PDH | 0,01 | 328 |
| 19 | 10 a 6 m | Segugio Italiano | F | PDH | 0,01 | 371 |
| 20 | 12 a 7 m | Barbone nano | F | PDH | 0,01 | 398 |
| 21 | 10 a 11 m | Briard | M | ADH | 0,31 | 383 |
| 22 | 11a | Lagotto | C | PDH | 0,01 | 133 |
| 23 | 9 a 2 m | Meticcio | S | PDH | 0,01 | 245 |
| 24 | 12 a 4 m | Bracco Tedesco | M | PDH | 0,01 | 200 |

| | | | | | | |
|----|----------|-----------------------|---|----------------|------------------|-------------------|
| 25 | 11 a 5 m | Boxer | M | PDH | 0,01 | 357 |
| 26 | 8a 10m | Meticcio | M | PDH | 0,01 | 253 |
| 27 | 13 a 5 m | Yorkshire Terrier | F | ADH | 0,36 | 203 |
| 28 | 11 a 4 m | Meticcio | F | PDH | 0,01 | 300 |
| 29 | 10a | Siberian Husky | F | PDH | 0,01 | 276 |
| 30 | 12 a 5 m | Volpino Italiano | F | PDH | 1,45 | 590 |
| 31 | 6a | Meticcio | M | PDH | 0,01 | 387 |
| 32 | 9a | Meticcio | F | PDH | 0,01 | 516 |
| 33 | 6a | West Highland Terrier | F | ADH | 0,39 | 120 |
| 34 | 15 a 1 m | Yorkshire Terrier | F | PDH | 0,01 | 208 |
| 35 | 10a | Boxer | M | PDH | 0,01 | 134 |
| 36 | 8a | Meticcio | M | PDH | 0,01 | 329 |
| 37 | 12a | Bassotto | S | PDH | 0,01 | 165 |
| 38 | 13a 1m | Yorkshire Terrier | C | PDH | 0,01 | 263 |
| 39 | 12a | Boxer | M | PDH | 0,34 | 243 |
| 40 | 5a 5 m | Boxer | M | PDH | 0,01 | 341 |
| 41 | 13a 5m | Barbone nano | F | ADH | 0,54 | 222 |
| 42 | 5a | Bassotto | M | PDH | 0,01 | 125 |
| 43 | 12a | Yorkshire Terrier | F | PDH | | |
| 44 | 9a | Boxer | M | PDH | 0,67 | 300 |
| | | | | Media±DS | 0,20±0,42 | 264±121,84 |
| | | | | Mediana | 0,01 | 253 |
| | | | | Valore minimo | 0,01 | 0 |
| | | | | Valore massimo | 1,63 | 590 |

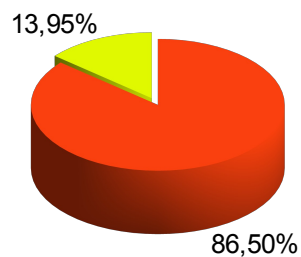
Tabella 6.1: dati relativi ai soggetti affetti da ipercortisolismo: età, razza, sesso e origine della patologia. Inoltre sono riportati i valori delle APPs valutate in tali soggetti. In grassetto sono evidenziati i valori al di fuori dei range di riferimento.

6.1.1 CRP E Hp IN CANI CON IPERCORTISOLISMO SPONTANEO

Le concentrazioni di CRP misurate in 43/44 cani del gruppo 1 sono risultate con valori compresi fra 0,01 e 1,63 mg/dl (Media ± DS: 0,20 ± 0,42; Mediana 0,01). In 6 soggetti (n° 1, 8, 17, 30, 41 e 44) è risultata superiore ai valori di riferimento (Tabella 6.1 e Figura 6.1).

Figura 6.2: CRP in 43/44 cani con Sindrome di Cushing. I valori risultano superiori ai range di riferimento nel 13,95% dei casi (fetta gialla).

CRP in 43 cani con Cushing



Le concentrazioni di Hp misurate in 43/44 cani, sono risultate di valori compresi fra 0 e 590 mg/dl (Media \pm DS: 264 \pm 121,85; Mediana 253). In 35/43 soggetti è risultata superiore ai valori di riferimento. In un solo soggetto (n°1) la Hp è risultata inferiore ai limiti di riferimento (Tabella 6.1 e Figura 6.2). Nei restati 7/43 cani le concentrazioni di Hp sono risultate normali.

Hp in 43 cani con cushing

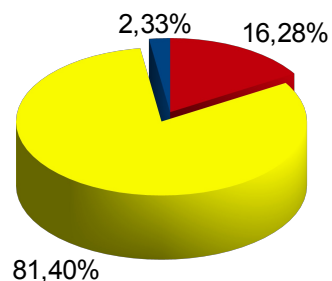


Figura 6.3: Hp in 43 cani con Sindrome di Cushing. Nell'81% dei soggetti le concentrazioni sono superiori ai valori di riferimento (fetta gialla), nel 16,28% sono normali (fetta rossa) nel 2,33% risulta diminuita (fetta blu).

6.1.2 CRP e Hp DURANTE LA TERAPIA CON TRILOSTANO

Nei soggetti in terapia con trilostano al primo controllo effettuato a 10-20 giorni dall'inizio del trattamento, la CRP, valutata in 19 soggetti, è risultata con valori compresi fra 0,01 e 7,03 mg/dl (Media \pm DS:: 0,83 \pm 2,01; mediana: 0,01). In 3 pazienti (n°1, 5 e 34) (15,8%) è risultata superiore ai valori di riferimento. I restanti 16 soggetti (84,2%) mostravano una CRP nei limiti di riferimento. L'Hp, valutata in 19 cani, è risultata con valori compresi tra 8 e 512 mg/dl (Media: 242,05 \pm 111,53; Mediana: 208). Un soggetto (n°1) presentava una Hp inferiore ai range di riferimento, un altro soggetto (n°35) mostrava una Hp nei range di riferimento, i restanti cani (89,5%), invece, mostravano valori superiori ai limiti di riferimento (Tabella 6.2).

Nei soggetti in terapia con trilostano, al secondo controllo effettuato a 30-60 giorni dall'inizio del trattamento, la CRP valutata in 13 soggetti, è risultata di valori

compresi fra 0,01 e 1,3 mg/dl (Media: $0,19 \pm 0,38$; Mediana: 0,01). In 2 cani (n°6 e 8) è risultata superiore ai range di riferimento. I restanti (84,6%), invece, hanno mostrato una CRP nella norma. L'Hp, valutata in 13 soggetti, è risultata di valori compresi tra 123 e 378 mg/dl (Media: $230,77 \pm 86,03$; Mediana: 252). Quattro pazienti (n°3, 6, 8 e 43) (30%) mostravano una Hp nei range di riferimento, nei restanti animali (69,2%), invece, si sono evidenziati valori superiori ai limiti di riferimento (Tabella 6.2).

| CASO | Post 10-20 gg trilostano | | Post 30-60gg trilostano | |
|------------|--------------------------|---------------|-------------------------|--------------|
| | CRP mg/dl | Hp mg/dl | CRP mg/dl | Hp mg/dl |
| 1 | 7,3 | 8 | | |
| 3 | 0,01 | 190 | 0,01 | 137 |
| 4 | 0,01 | 208 | | |
| 5 | 5,45 | 275 | 0,01 | 173 |
| 6 | | | 1,3 | 123 |
| 8 | 0,01 | 179 | 0,61 | 132 |
| 9 | 0,01 | 193 | | |
| 10 | 0,13 | 186 | | |
| 12 | 0,01 | 512 | 0,01 | 378 |
| 14 | 0,01 | 256 | 0,01 | 194 |
| 15 | 0,01 | 395 | 0,01 | 320 |
| 16 | 0,01 | 336 | 0,01 | 312 |
| 18 | 0,01 | 260 | | |
| 20 | 0,01 | 310 | | |
| 28 | 0,01 | 297 | 0,01 | 298 |
| 31 | 0,01 | 347 | 0,15 | 271 |
| 32 | | | 0,01 | 252 |
| 34 | 2,62 | 174 | | |
| 35 | 0,01 | 108 | | |
| 37 | 0,01 | 164 | | |
| 43 | 0,48 | 201 | 0,01 | 135 |
| 44 | | | 0,38 | 275 |
| Media ± DS | 0,83 ± 2,01 | 242,05±111,53 | 0,19 ± 0,38 | 230,77±86,03 |
| Mediana | 0,01 | 208 | 0,01 | 252 |
| Min-Max | 0,01-7,3 | 8-512 | 0,01-1,3 | 123-378 |

Tabella 6.2: dati relativi alle concentrazioni di CRP e Hp nei soggetti con Sindrome di Cushing (gruppo 1) durante il trattamento con trilostano. In grassetto sono riportati i valori al di fuori dell'intervallo di riferimento.

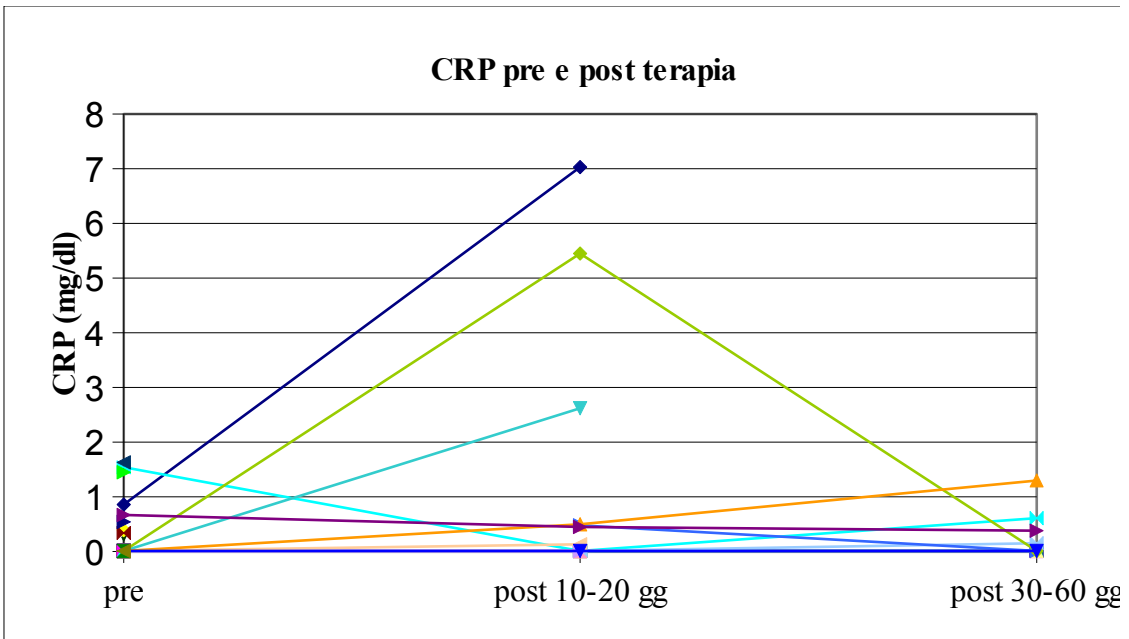


Figura 6.4: andamento delle concentrazioni di CRP durante la terapia con trilostano a 10-20 e a 30-60 giorni dall'inizio del trattamento in cani affetti da Sindrome di Cushing

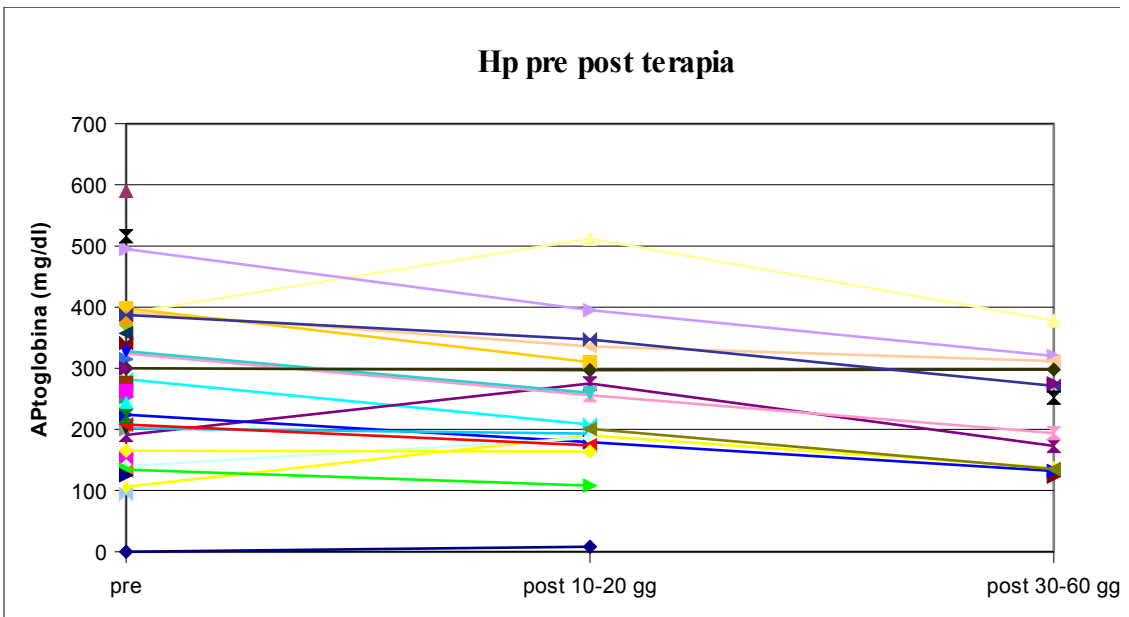


Figura 6.5: andamento delle concentrazioni di Hp in cani affetti da Sindrome di Cushing durante la terapia con trilostano a 10-20 e a 30-60 giorni dall'inizio del trattamento.

6.2 SOGGETTI AFFETTI DA ALTRE PATOLOGIE NON SINDROME DI CUSHING

Per quanto concerne il gruppo 2, 22 cani di età, sesso, razza e taglia variabili affetti da differenti tipi di patologie rispondevano ai criteri di inclusione. I soggetti avevano un'età compresa tra 1 e 15 anni (media $9,5 \pm 3,7$); 9 erano meticci, 2 Pointer, e gli altri 11 di altre razze rappresentate da un solo soggetto; 16 erano maschi (di cui 1 castrato) e 6 femmine (di cui 4 sterilizzate). In tabella 6.3 sono riportati i dati relativi ai soggetti del gruppo 2: età, razza, sesso, patologia diagnosticata e concentrazioni di CRP ed Hp al momento della diagnosi. In tabella 6.4 sono riportati i valori di CRP e Hp dopo il trattamento con corticosteroidi.

| Caso | Età (anni) | Razza | Sesso | Diagnosi | CRP mg/dl | Hp mg/dl |
|------|------------|------------------|-------|---|-----------|----------|
| 1 | 13 | Meticcio | M | Endocardiosi mitralica IRC | 0,01 | 151 |
| 2 | 12 | Alaskan Malamute | MC | Mieloma multiplo | 0,01 | 88 |
| 3 | 7 | Meticcio | F | Ehrlichiosi | 1,16 | 367 |
| 4 | 15 | Meticcio | M | Ehrlichiosi | 0,83 | 170 |
| 5 | 12 | Yorkshire | Fs | Linfoma orale | 0,01 | 202 |
| 6 | 12 | Meticcio | M | Linfoma intestinale | 3,23 | 141 |
| 7 | 12 | Meticcio | M | Compressione midollare da ernia discale | 1,29 | 157 |
| 8 | 5 | Pointer | M | Endocardite, artrosinovite | 26,8 | 3 |
| 9 | 11 | Dalmata | M | Linfoma, IRC | 6,87 | 125 |
| 10 | 9 | Pointer | FS | Piastrinopenia immunomediata | 26,53 | 274 |
| 11 | 5 | Meticcio | FS | Artropatia immunomediata | 5,27 | |
| 12 | 5 4 | Pinscher | M | Ehrlichiosi | 3,11 | 502 |

| | | | | | | |
|-------------------|----|----------------------|----|-----------------------------------|-------------------|-----------------------|
| 13 | 1 | Beagle | M | SRMA | 19,8 | |
| 14 | 11 | Bull terrier Inglese | M | Pneumopatia, linfadenopatia | 19,03 | 526 |
| 15 | 4 | Bracco ungherese | M | Pneumopatia, pat immunomediata | 20,59 | |
| 16 | 9 | Shitzu | M | Anemia emolitica immunomediata | 2,3 | |
| 17 | 8 | Meticcio | F | Leishmaniosi | 0,03 | 374 |
| 18 | 10 | Samoiedo | M | Leishmaniosi | 0,01 | 179 |
| 19 | 12 | Meticcio | M | Stenosi esofagea | 0,01 | 353 |
| 20 | 15 | Meticcio | M | Sintomatologia prosencefalica | 0,94 | 84 |
| 21 | 11 | Setter Gordon | M | Enteropatia | 0,01 | 45 |
| 22 | 9 | Pastere Maremmano | Fs | Gastropatia | 0,01 | 365 |
| Media | | | | | 6,28 ± 9,36 | 228,12 ± 153,60 |
| Mediana | | | | | 1,23 | 174,5 |
| Valore minimo | | | | | 0,01 | 3 |
| Valore massimo | | | | | 26,53 | 526 |

Tabella 6.3: dati relativi ai 22 soggetti appartenenti al gruppo 2, segnalamento, patologia diagnosticata all'ammissione e concentrazioni di CRP e Hp.

| Caso | TRATTAMENTO | Durata del trattamento tra le due misurazioni di CRP | CRP post mg/dl | Hp post mg/dl |
|---------|--|--|----------------|-------------------|
| 1 | Prednisone 0,5 mg/kg SID | 30 gg | 0,01 | 202 |
| 2 | Prednisone 1 mg/kg | 30 gg | 3 | 387 |
| 3 | Prednisone 1 mg/kg | 16 gg | 5,42 | 362 |
| 4 | Prednisone | 20 gg | 0,23 | 169 |
| 5 | Prednisone | 30 gg | 0,01 | 141 |
| 6 | Prednisone | 30 gg | 1,84 | 189 |
| 7 | Metilprednisolone 1 mg/kg | 2 gg | 0,13 | 251 |
| 8 | Prednisone 1 mg/kg SID | 5 gg | 7,05 | 236 |
| 9 | Prednisone 1 mg/Kg BID | 3 gg | 3,01 | 352 |
| 10 | Metilprednisolone 2 mg/Kg BID | 5 gg | 4,77 | 390 |
| 11 | Prednisone 2 mg/Kg BID x 3 gg poi SID x 4 gg poi 1 mg/Kg SID | 21 gg | 6,75 | |
| 12 | Prednisone 1 mg/Kg SID | 7 gg | 0,18 | |
| 13 | Prednisone 1 mg/Kg BID | 14 gg | 0,49 | |
| 14 | Metilprednisolone 1 mg/Kg SID IV | 6 gg | 3,13 | 394 |
| 15 | Prednisone 1 mg/Kg SID | 4 gg | 6,06 | |
| 16 | Prednisone 1 mg/Kg BID | 14 gg | 5,61 | |
| Media | | | 2,98 ±2,65 | 279,36 ± 98,61 |
| Mediana | | | 3,01 | 251 |
| Min-Max | | | 0,01-7,05 | 141-394 |

Tabella 6.4: dati relativi alle concentrazioni di CRP e Hp nei soggetti con differenti patologie (non-Sindrome di Cushing) dopo il trattamento con corticosteroidi esogeni.

6.3 GRUPPO DEI SOGGETTI SANI

Nel gruppo 3 sono stati inclusi 14 soggetti di differente età, razza, sesso e peso, che hanno risposto ai criteri di inclusione; 8 erano meticci, 2 Boxer, 1 Golden Retriever, 1

Espagneul Breton, 1 Bouledogue francese e 1 Rottweiler; 12 di questi soggetti erano femmine di cui 7 sterilizzate e 2 maschi. L'età dei soggetti era compresa tra i 6 e i 13 anni d'età. In tabella 6.5 sono riportati i risultati delle concentrazioni di CRP e Hp nei cani inclusi nel gruppo di controllo (Gruppo 3).

| SANI | CRP mg/dl | Hp (mg/dl) |
|----------------|-----------------|-------------------|
| 1 | 0,01 | 33 |
| 2 | 0,01 | 30 |
| 3 | 0,01 | 6 |
| 4 | 0,01 | 1 |
| 5 | 0,01 | 69 |
| 6 | 3,58 | 52 |
| 7 | 0,01 | 68 |
| 8 | 0,01 | 34 |
| 9 | 0,01 | 43 |
| 10 | 0,01 | 180 |
| 11 | 0,01 | 151 |
| 12 | 0,01 | 25 |
| 13 | 0,01 | 1 |
| 14 | 0,01 | 72 |
| Media \pm DS | 0,27 \pm 0,96 | 54,64 \pm 52,86 |
| Mediana | 0,01 | 38,5 |
| Min-Max | 0,01-358 | 01/01/80 |

Tabella 6.5: concentrazioni di CRP e Hp in 14 cani sani.

6.4 ANALISI STATISTICA DEI DATI

6.4.1 CANI CON SINDROME DI CUSHING PRE E POST TRATTAMENTO

Per quanto concerne l'analisi statistica effettuata sui dati relativi al gruppo 1, non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa tra le concentrazioni di CRP al momento della diagnosi e quelle misurate a 10-20 e 30-60 giorni dall'inizio del trattamento con trilostano.

Per quanto concerne la Hp, invece, è stata evidenziata una diminuzione statisticamente significativa dopo 30-60 giorni di terapia con trilostano, ma non a 10-20 giorni dall'inizio del trattamento.

6.4.2 CANI MALATI NON-SINDROME DI CUSHING PRE E POST TRATTAMENTO

Nel gruppo dei cani affetti da differenti patologie (non-Sindrome di Cushing) le concentrazioni di CRP rilevate al momento della diagnosi sono risultate significativamente maggiori rispetto a quelle dopo il trattamento con corticosteroidi ($p=0,0286$). Non è stata evidenziata una differenza significativa per quanto concerne la Hp ($p=0,0757$).

pre-terapia ($P < 0,0001$). Le concentrazioni di CRP dei soggetti con differenti patologie dopo il trattamento con corticosteroidi sono risultate significativamente maggiori rispetto ai soggetti con Sindrome di Cushing ($p < 0,0001$).

Per quanto concerne le concentrazioni di CRP del gruppo dei cani malati non-Sindrome di Cushing pre-trattamento con corticosteroidi, sono risultate significativamente maggiori rispetto a quelle dei soggetti sani ($p = 0,0006$).

Le concentrazioni di Hp nei cani malati non-Sindrome di Cushing pre-trattamento e post-trattamento con corticosteroidi sono risultate statisticamente maggiori rispetto quelle dei soggetti sani (rispettivamente $p = 0,0003$ e $p < 0,0001$).

Le concentrazioni di Hp sono risultate significativamente maggiori nei cani affetti da Sindrome di Cushing pre-trattamento rispetto ai cani sani ($p < 0,0001$), non sono risultate, invece, differenti rispetto a quelle dei soggetti malati non-Sindrome di Cushing pre-terapia ($p = 0,3360$) e nemmeno post-terapia ($p = 0,7009$).

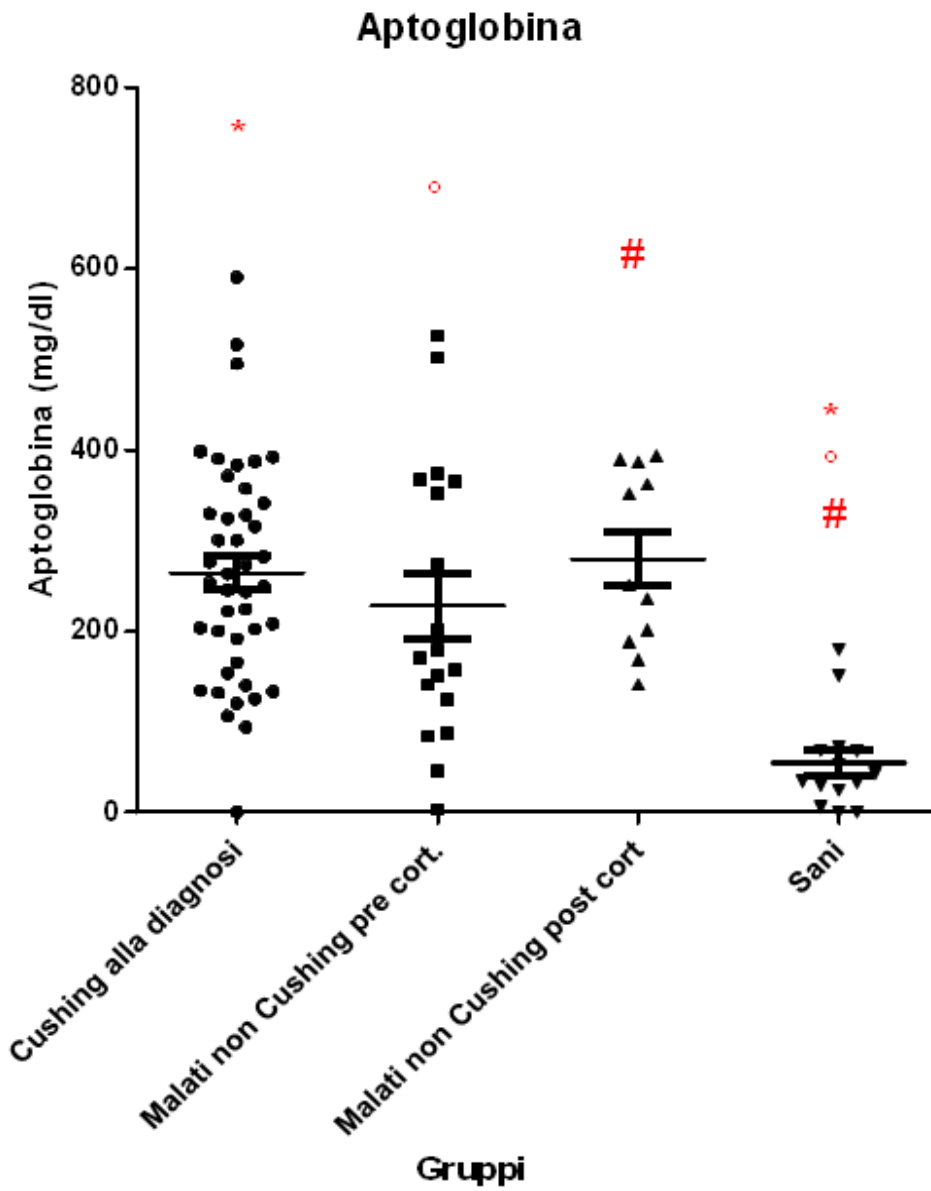


Illustrazione 6.4: concentrazioni di Hp nei vari gruppi. Le differenze statisticamente significative sono segnalate con i simboli *, ° e #.

CAPITOLO 7

Discussione e Conclusioni

L'influenza dei corticosteroidi sulle proteine di fase acuta nel cane non è ancora del tutto chiara in Medicina Veterinaria. Gli studi effettuati in passato hanno dimostrato ampiamente l'effetto sulle concentrazioni di Hp (Harvey e West, 1987; Martinez-Subiela et al, 2004; MacGrotty et al, 2005; Caldin et al, 2009; Arteaga et al, 2010), tuttavia sono ancora scarsi i dati relativi all'influenza di tali ormoni sulle altre APPs; in particolare i dati sulla CRP in letteratura sono discordanti e frammentari. Negli ultimi anni da una parte si è discussa l'assenza (Martinez-Subiela et al, 2004; Bathen-Noethen et al, 2008) o la presenza (Caldin et al, 2009) di un'influenza dei corticosteroidi sulle concentrazioni di CRP, dall'altra sono stati pubblicati sempre più studi riguardanti patologie su base immunomediata che richiedono un trattamento con corticosteroidi e al contempo un monitoraggio attraverso l'utilizzo della CRP (Jergens et al, 2003; Bathen-Noethen et al, 2008; Lowrie et al, 2009a; Lowrie et al, 2009b; Mitchell et al, 2009). Risulta pertanto fondamentale capire in che modo i corticosteroidi possano influenzare le concentrazioni di CRP e valutare se tale influenza risulti un limite per il clinico o se possa essere sfruttata in modo vantaggioso.

7.1 CRP e HP NEI SOGGETTI CON SINDROME DI CUSHING

Le concentrazioni di Hp nel gruppo 1 (soggetti affetti da ipercortisolismo spontaneo) sono risultate superiori ai valori di riferimento nell' 81,40% dei soggetti con valori di media \pm DS di $264 \pm 121,85$ e mediana di 253 (0-590 mg/dl). Tali dati sono risultati

sovrapponibili a quelli già pubblicati in letteratura; anche nel nostro studio, come in quello di Caldin e collaboratori (2009) le concentrazioni di Hp risultavano 10 volte maggiori rispetto ai cani sani e, al pari dello studio di McGrotty e collaboratori (2005) effettuato su 12 cani con ipercortisolismo spontaneo, le concentrazioni di Hp sono risultate superiori ai valori di riferimento in circa l'80 % dei casi. Il meccanismo attraverso il quale il cortisolo comporterebbe un aumento della sintesi di Hp non è chiaro, è stato ipotizzato, tuttavia, che possa essere un'induzione epatica da parte dei corticosteroidi in modo simile alla fosfatasi alcalina (Caldin et al, 2009). Nel nostro studio un soggetto (n°1) ha mostrato concentrazioni di Hp pari a 0, tale soggetto era affetto, oltre che da ipercortisolismo spontaneo, da una massa mediastinica e dall'esame emocromocitometrico si evidenziavano segni di emolisi, pertanto tale valore di Hp potrebbe essere legato alla presenza di un processo emolitico che determina una notevole diminuzione delle concentrazioni di Hp (Cerón et al, 2005). Negli studi sopra citati, non sono descritti casi affetti da ipercortisolismo spontaneo con Hp pari a 0.

Le concentrazioni di CRP sono risultate simili a quelle dei soggetti sani, con valori, quindi, estremamente bassi. Questi dati sono sovrapponibili a quelli descritti da Caldin e collaboratori (2009); nel loro gruppo di soggetti con ipercortisolismo non complicato da patologie infiammatorie concomitanti le concentrazioni di CRP sono risultate sovrapponibili a quelle del loro gruppo di cani sani. C'è da sottolineare che la differenza sostanziale tra il nostro studio ed il loro è che nel nostro gruppo non c'è stata una suddivisione in sottogruppi, nel nostro gruppo 1, infatti, sono stati inclusi indistintamente soggetti con e senza patologie concomitanti. I 6 casi (13,6%) con CRP superiore ai valori di riferimento (1, 8, 17, 30, 41 e 44), che tuttavia presentavano un aumento moderato, soffrivano di differenti patologie concomitanti, ad esempio il caso n°1 presentava una massa mediastinica ed anemia emolitica, i casi n° 8 e 30 erano affetti da concomitante diabete mellito, il caso n° 30 presentava in anamnesi vomito, e il caso n° 8 aveva da poco tempo subito una laparoscopia per una biopsia epatica, i casi n°17 e 44 presentavano una grave piodermite. Occorre evidenziare che i valori di CRP di questi soggetti non hanno raggiunto una magnitudo di aumento tipico delle proteine di fase

acuta maggiori in corso di gravi patologie infiammatorie. Il numero di cani con CRP superiore ai valori di riferimento (13,6%) è risultato simile a quello di altri studi (9,09%) (Arteaga et al, 2010). Se si calcola la mediana dei soli valori superiori ai range di riferimenti si ottiene un valore di 1,16 il quale risulta circa 100 volte maggiore rispetto alla mediana dei valori dell'intero gruppo. In questi sei cani, l'aumento della CRP può essere quindi considerato decisamente inadeguato se si pensa che le concomitanti patologie che abbiamo citato solitamente determinano un aumento ben più cospicuo di tale proteina. Presumibilmente, quindi, la CRP in corso di ipercortisolismo, si eleva solo in corso di insulti particolarmente gravi in grado di superare l'effetto inibitorio del cortisolo. La CRP gode di una sensibilità decisamente elevata nello svelare processi infiammatori e/o insulti tissutali, tuttavia solo in pochi casi in questo gruppo tale proteina è risultata aumentata. Tenendo conto che in linea generale il 40-50% dei soggetti con Sindrome di Cushing presenta infezioni delle vie urinarie (Lulich e Osborne, 1994) e che frequentemente questi soggetti manifestano anche infezioni cutanee importanti (Scott et al, 2001; Hillier e Desch, 2002) risulta strana l'elevata percentuale di soggetti con CRP nella norma. Si può quindi sospettare che la risposta di fase acuta della CRP nei cani con Sindrome di Cushing possa essere "soffocata" dalla presenza in circolo di elevate concentrazioni di cortisolo il quale possiede una potente azione antiinfiammatoria. L'ipotesi più probabile di questo fenomeno è che, essendo l'inibizione della sintesi e del rilascio di IL-1 da parte dei macrofagi uno degli effetti anti-infiammatori dei glucocorticoidi, ed essendo la CRP classificabile come APPs di tipo 1, cioè la cui sintesi è prevalentemente regolata dalla IL-1 e sinergicamente dalla IL-6, è possibile che un eccesso di corticosteroidi sopprima la sintesi ed il rilascio di CRP. Non bisogna dimenticare che anche la Hp, la SAA e l'AGP sono considerate APPs di tipo 1 al pari della CRP, tuttavia la Hp subisce un aumento in corso di ipercortisolismo spontaneo o iatrogeno e non una diminuzione.

7.2 CRP e HP DOPO IL TRILOSTANO

Le concentrazioni di CRP non hanno subito un cambiamento significativo durante la terapia con trilostano, tuttavia in alcuni soggetti (n°1,5 10 e 34), i quali presentavano CRP normale all'ammissione, si è verificato un aumento importante delle concentrazioni di tale proteina dopo circa 10-20 giorni dall'inizio della terapia con trilostano. Questo fenomeno potrebbe essere attribuibile all'insorgenza di un fenomeno infettivo/infiammatorio ex novo oppure si potrebbe supporre che la diminuzione del cortisolo ematico avesse permesso di svelare una risposta infiammatoria già presente all'ammissione ma che risultava soppressa dalle alte concentrazioni di cortisolo.

Le concentrazioni di Hp diminuivano in modo progressivo durante la terapia con trilostano, raggiungendo una diminuzione statisticamente significativa solo dopo 30-60 giorni dall'inizio della terapia. Tale reperto è in linea con i dati presenti in letteratura (McGrotty et al, 2005; Arteaga et al, 2010) dove la Hp pur rimanendo nella maggior parte dei casi superiore ai valori di riferimento, subisce un decremento significativo durante il trattamento con trilostano. Presumibilmente la diminuzione della cortisolemia determina una progressiva e lenta diminuzione delle concentrazioni di Hp.

7.3 CRP e HP NEI MALATI NON-SINDROME DI CUSHING

Il gruppo dei soggetti con differenti patologie è un gruppo estremamente eterogeneo sia per quanto concerne il tipo di patologia diagnosticata che per il trattamento eseguito. Avere un gruppo di soggetti con patologie estremamente differenti per eziologia e che sono stati sottoposti a trattamento con differenti corticosteroidi, a differenti dosaggi ed avere valori post-trattamento a tempi differenti sono limiti da tenere in considerazione in questa parte dello studio. Come atteso, le concentrazioni di CRP sono risultate significativamente maggiori rispetto ai soggetti sani e diminuivano

in modo significativo dopo il trattamento con corticosteroidi esogeni. Tale reperto è in linea con studi effettuati in precedenza in cui patologie su base infettiva, infiammatoria, immunomediata o neoplastica erano caratterizzate da aumenti anche cospicui della CRP, la quale poi diminuiva progressivamente con l'estinguersi del processo o con il trattamento adeguato. I corticosteroidi in particolare sono utilizzati ampiamente in medicina veterinaria in corso di numerose patologie.

Nel nostro gruppo di malati non-Sindrome di Cushing comparivano casi in cui la CRP all'ammissione risultava nella norma. Come già detto in precedenza, ci sono patologie su base infiammatoria che non determinano aumenti significativi della CRP, come ad esempio patologie infiammatorie a carico dell'apparato gastro enterico (caso n° 19, 21 e 22). Patologie con andamento cronico possono non determinare un aumento di CRP (caso n° 1, 2, 5, 17 e 18), tuttavia i casi n° 8 e 10 sono due soggetti affetti da Leishmaniosi, la quale generalmente determina un aumento moderato delle concentrazioni di CRP (Martínez-Subiela et al, 2003), nel nostro studio, invece, tale reperto non si è verificato. C'è da sottolineare che la sensibilità della CRP nel rilevare pazienti con Leishmaniosi non è del 100% (Martínez-Subiela et al, 2003). Le concentrazioni maggiori di CRP si sono evidenziate nei soggetti con patologie su base immunomediata, tale reperto è in linea con la letteratura attuale (Cerón et al, 2005). Le concentrazioni di Hp si sono rivelate, come atteso, statisticamente maggiori rispetto ai cani sani, ma non sono risultate differenti rispetto ai cani con Sindrome di Cushing. Tale reperto può essere giustificato dal fatto che entrambi i gruppi possono essere affetti da patologie su base infiammatoria che possono innalzare le concentrazioni di Hp in modo analogo nei due gruppi, oppure si può ipotizzare che lo stimolo infiammatorio e lo stimolo glucocorticoideo possano determinare un aumento simile di tale proteina.

7.4 CRP E HP DOPO I CORTICOSTEROIDI ESOGENI

La diminuzione delle concentrazioni di CRP in seguito al trattamento con corticosteroidi può essere dovuta all'effetto anti-infiammatorio di tale molecola e quindi all'estinzione del processo infiammatorio nel paziente trattato, oppure può essere giustificato in parte anche da un'azione diretta dei corticosteroidi sulle concentrazioni di CRP di cui non si conosce il meccanismo. I farmaci antiinfiammatori non steroidei come il carprofen, l'etodolac, il meloxicam e il butorfanolo sono stati utilizzati in uno studio sperimentale su 12 Beagle in cui è stata indotta un'artrite acuta. Dopo 24 ore dalla somministrazione dei vari FANS, non si è verificata una diminuzione statisticamente significativa delle concentrazioni di CRP, nonostante tali molecole raggiungessero la concentrazione plasmatica massima in poche ore (Borer et al, 2003). Questi risultati non possono essere confrontati con i nostri, in quanto la CRP post-trattamento con corticosteroidi nel nostro studio è stata valutata dopo tempi variabili e molto più lunghi rispetto allo studio sopra citato, tuttavia tale confronto offre spunti di discussione interessante sul fatto che il meccanismo d'azione dei FANS, non agendo sulle IL-1 e 6, non determini presumibilmente una diminuzione delle concentrazioni di CRP a meno che non ci sia un'effettiva estinzione del processo patologico sottostante.

Il caso n° 3, nonostante il trattamento con corticosteroidi, ha subito un aumento importante delle concentrazioni di CRP, tale dato può essere giustificato dal fatto che il paziente si è presentato con piometra al momento del controllo dopo 16 giorni di trattamento con corticosteroidi.

7.5 DIFFERENZE TRA I GRUPPI

Dal confronto fra i vari gruppi del nostro studio emergono indubbiamente alcuni dati interessanti. Ad esempio i soggetti con Sindrome di Cushing hanno mostrato concentrazioni di CRP statisticamente inferiori rispetto ai soggetti sottoposti a terapie con corticosteroidi esogeni. Tale reperto può essere dovuto al fatto che nei soggetti

malati, nonostante il trattamento, fosse ancora presente lo stimolo infiammatorio della patologia sottostante. Un'altra giustificazione a questo dato può essere legata al fatto che i pazienti sottoposti a terapie corticosteroidi hanno subito trattamenti con dosaggi variabili e che la concentrazione di CRP è stata valutata in momenti differenti da caso a caso. Un'altra spiegazione può risiedere nel fatto che i corticosteroidi endogeni nei soggetti con Sindrome di Cushing sono uno stimolo costante, cronico ed intenso per l'organismo, i trattamenti con corticosteroidi esogeni non sempre, invece, determinano un reale ipercortisolismo iatrogeno. La sensibilità ai corticosteroidi, inoltre, come già detto in precedenza, può essere influenzata da numerosi fattori ed essere estremamente differente da soggetto a soggetto.

Se la CRP è risultata differente nelle tre condizioni (soggetti con Sindrome di Cushing, soggetti malati non-Sindrome di Cushing e soggetti malati non-Sindrome di Cushing post trattamento), la Hp invece, non ha manifestato alcuna differenza statisticamente significativa. Una spiegazione può essere ricercata nella minore sensibilità della Hp rispetto alla CRP oppure si può ipotizzare che la CRP, a differenza di quanto si sia creduto fino ad oggi, sia estremamente influenzata dai corticosteroidi, ancor più di quanto non lo sia la Hp.

I limiti di tale studio sono legati al fatto di essere stato un lavoro effettuato su campo, in condizioni non sperimentali, su pazienti afferenti per diverse condizioni patologiche e con necessità terapeutiche differenti. Tale condizione ha comportato la mancanza di alcuni dati e ad avere gruppi disomogenei per quanto concerne i protocolli terapeutici, e le date dei controlli. Un altro limite di questo studio è stato indubbiamente quello di non aver classificato i pazienti affetti da Sindrome di Cushing in base alla presenza o meno di patologie concomitanti. Sarebbe stato corretto applicare su tutti soggetti un protocollo standardizzato comprensivo di esame batteriologico delle urine.

7.6 CONCLUSIONI

Gli Autori che fino ad oggi hanno affrontato l'argomento delle APPs in corso di ipercortisolismo iatrogeno o spontaneo le hanno considerate non utili nel monitoraggio della Sindrome di Cushing durante il trattamento con trilostano (Arteaga et al, 2010) e pessimi marker di infiammazione nei soggetti affetti da tale disendocrinia; l'effetto dei corticosteroidi endogeni o esogeni sulle concentrazioni di tali APPs può influenzare fortemente la sensibilità di tali marker nello svelare processi infiammatori sottostanti. Conoscere a fondo i meccanismi e le dinamiche attraverso i quali i corticosteroidi potenzialmente influenzano le concentrazioni ematiche delle APPs può risultare di valido ausilio per il clinico. Nell'interpretazione delle APPs in corso di ipercortisolismo occorre ricordare che:

- i corticosteroidi aumentano le concentrazioni di Hp, diminuiscono quelle di CRP e sembrano non influire quelle di AGP e di Albumina (Caldin et al, 2009; Mitchell et al, 2009)
- la presenza di moderati aumenti di CRP in pazienti con ipercortisolismo spontaneo o iatrogeno può far sospettare la presenza di una condizione di particolare gravità;
- la presenza di concentrazioni elevate di Hp con CRP nella norma può far sospettare l'esistenza di un ipercortisolismo spontaneo o iatrogeno;
- il rilievo di una CRP nella norma in un paziente con ipercortisolismo spontaneo o iatrogeno non deve portare necessariamente ad escludere un processo infiammatorio sottostante.

Ulteriori studi effettuati con protocolli diagnostici e terapeutici standardizzati potrebbero, in futuro, apportare nuove conoscenze sull'argomento e svelare in che modo, con quali tempistiche e a quali dosaggi i corticosteroidi esogeni ed endogeni influenzino le concentrazioni delle APPs nel cane. Lo studio più approfondito di tali meccanismi potrebbe, infatti, fornire al clinico nuove indicazioni per l'interpretazione dei risultati e far sì che le elevate concentrazioni di corticosteroidi esogeni ed endogeni non siano più un limite all'utilizzo delle APPs nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

- **Abate O, Zanatta R, Malisano T, Dotta U** - Canine serum protein patterns using high-resolution electrophoresis (HRE). *Vet J* **159**: 154-60, 2000.
- **Adams ME** – Cartilage research and treatment of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **4**: 552, 1992.
- **Alexandrakis MG, Passam FH, Ganotakis ES, Sfiridaki K, Xilouri I, Perisinakis K, Kyriakou DS** - The clinical and prognostic significance of erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum interleukin-6 (IL-6) and acute phase protein levels in multiple myeloma. *Clinical and Laboratory Haematology* **25**: 41–46, 2003.
- **Andersson M, Sevelius E** - Abnormal microheterogeneity of haptoglobin in from dogs with various diseases. *Veterinary Record* **148**: 14–17, 2001.
- **Andersson M, Stenstrom M, Vatne M, Sevelius E, Jonsson L** – Diseaserelated variations of the glycosylation of haptoglobin in the dog. *Journal of Comparative Pathology* **119**:227-238, 1998.
- **Armstrong PB, Quigley JP** - Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev Comp Immunol* **23**:–390, 1999.
- **Arteaga A, Dhand NK, McCann T, Knottenbelt CM, Tebb AJ, Evans H, Eckersall PD, Ramsey IK** – Monitoring the response of canine hyperadrenocorticism to trilostane treatment by assessment of acute phase protein concentrations. *Journal of Small Animal Practice* **51**:204-209, 2010.
- **Bathen-Noethen A, Carlson R, Menzel D, Mischke R, Tipold A** - Concentrations of Acute-Phase Proteins in Dogs with Steroid Responsive Meningitis-Arteritis. *J Vet Intern Med* **22**:–1156, 2008.
- **Baumann H, Gauldie J** – The acute phase response. *Immunology Today* **15**: 74-80,

1994. .

- **Bayer L, Schöntube M, Dörffel W** - CRP, IL-6 und PCT als Infektionsparameter bei onkologisch kranken Kindern. (C-reactive protein, interleukin-6 and procalcitonin as parameters of infection in pediatric patients with oncologic diseases). *Klinische Pädiatrie* **212**: 326–331, 2000.
- **Bayramli G, Ulutas B** - Acute phase protein response in dogs with experimentally gastric mucosal injury. *Vet Clin Pathol***37**: 312–316, 2008.
- **Bayramli G, Ulutas B** - Acute phase protein response in dogs with induced gastric mucosal injury. *Veterinary Clinical Pathology***37**: 312–316, 2008.
- **Behrend EN, Kemppainen RJ** – Diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **31**: 985-1003 , 2001.
- **Behrend EN, Kennis R** - Atypical Cushing's syndrome in dogs: arguments for and against. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **40(2)**: 285-96, 2010.
- **Bell R, Neiger R, McGrotty Y, et al** – Study of the effects of once daily doses of trilostane on cortisol concentration and responsiveness to adrenocorticotrophic hormone in hyperadrenocorticoid dogs. *Vet Rec* **159**: 277-281, 2006.
- **Bence LM, Addie DD, Eckersall PD** - An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. *Vet Clin Pathol* **34**: 335-41, 2005.
- **Benckroun G, de Fornel-Thibaud P, Rodríguez Piñeiro MI, Rault D, Besso J, Cohen A, Hernandez J, Stambouli F, Gomes E, Garnier F, Begon D, Maurey-Guenec C, Rosenberg D** - Ultrasonography criteria for differentiating ACTH dependency from ACTH independency in 47 dogs with hyperadrenocorticism and equivocal adrenal asymmetry. *J Vet Intern Med* **24**: 1077-85, 2010.
- **Biewenga WJ, Rijnberk A, Mol JA** - Osmoregulation of systemic vasopressin release during long-term glucocorticoid excess: a study in dogs

with hyperadrenocorticism. *Acta Endocrinologica (Copenh)* **124**: 583-588, 1991.

- **Biller BMK, Grossman AB, Stewart PM et al** - Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's Syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 2454-2462, 2008.
- **Bjerre A, Brusletto B, Hoiby EA, Kierulf P, Brandtzaeg P** - Plasma interferon-gamma and interleukin-1 concentrations in systemic meningococcal disease compared with severe systemic Grampositive septic shock. *Critical Care Medicine* **32**:433-438, 2004.
- **Bodine PV, Litwack G** - The glucocorticoid receptor and its endogenous regulators. In Litwack G (de): Receptor, p83. Humana Press, 1990.
- **Boothe DM, Mealey KA** - Glucocorticoid therapy in the dog and cat. In: Boothe DM: Clinical Pharmacology and Therapeutics cap 17. pag 313-329 Eds WB Saunders, 2001.
- **Borer LR, Peel JE, Seewald W, Schawald P, Spreng DE** - of carprofen, etodolac, meloxicam, or butorphanol in dogs with induced acute synovitis. *AJVR* **64**:1429-1437, 2003.
- **Bremner KC** - Studies on haptoglobin and haemopexin in the plasma of cattle. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **42**:643-656, 1964.
- **Briese V, Willroth PO, Brock J, Straube W** - Tumor markers (alpha-2-macroglobulin, secretory immunoglobulin A, pregnancy-associated alpha-2-glycoprotein) in the serum of patients with bronchial carcinoma. *Arch Geschwulstforsch* **54**:391-398, 1984.
- **Bruyette DS, Ruehl WW, Entriken T, et al** - Management of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism with l-deprenyl (Anipryl). *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **27**:273-286, 1997.
- **Bulent U, Goksel B, Pinar AU, Tulin K** - Serum concentration of some acute phase

proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Vet Clin Pathol* 34: 144–147, 2005.

- **Burnstein KL, Cidlowski JA** – The down side of glucocorticoid receptor regulation. *Mol Cell Endocrinol* **83**: C1, 1992.
- **Bürger W, Ewald C, Fennert EM** - Increase C-reactive protein in the serum of piglets (pCRP) following ACTH or corticosteroid administration. *Zentralbl Veterinarmed B.* **45**:1–6, 1998.
- **Caldin M, Tasca S, Carli E, Bianchini S, Furlanello T, Martinez-Subiela S, Ceron JJ** - Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Veterinary Clinical Pathology***38**:63–68, 2009.
- **Campbell WB** – Lipid-derived autocooids: eicosanoids and platelet activating factor. In Gilman AG, Rall TW, et al, (eds): *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed, p 600. New York. Pergamon Press, 1990.
- **Carr AP, Panciera DL, Kidd L.** - Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: A retrospective study of 72 dogs. *J Vet Intern Med***16**:504–509, 2002.
- **Carrigan SD, Scott G, Tabrizian M** - resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clinical Chemistry***50**:1301–1314, 2004.L
- **Caspi D, Baltz ML, Snel F, Gruys E, Nivt D, Batt RM, Munn EA, Buttress N, Pepys MB** - Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology***53**:307-313, 1984.
- **Caspi MD, Snel FWJJ, Batt RM, et al.** - C-reactive protein in dogs. *Am J Vet Res***48**:919–921, 1987.
- **Castillo VA, Cabrera Blatter MF, Gómez NV, Sinatra V, Gallelli MF, Ghersevich MC** - Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and

in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Res Vet Sci* **86(2)**: 223-9, 2009.

- **Castillo V, Giacomini D, Páez-Pereda M, Stalla J, Labeur M, Theodoropoulou M, Holsboer F, Grossman AB, Stalla GK, Arzt E** - Retinoic acid as a novel medical therapy for Cushing's disease in dogs. *Endocrinology* **147(9)**: 4438-44, 2006.
- **Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S** - Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol***34**:85–99, 2005.
- **Cerón JJ, Martínez-Subiela S** – An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Veterinary Research* **35**: 671-679, 2004.
- **Chan D, Rozanski E, Freeman L** - Relationship between plasma amino acids, C-reactive protein, illness severity and outcome in critically ill dogs. *J Vet Intern Med* **20**:755, 2006.
- **Chan DL, Rozanski EA, Freeman LM** - Relationship among plasma amino acids, C-Reactive protein, severity, and outcome in critically ill dogs. *J Vet Intern Med***23**:559–563, 2009.
- **Chastain CB, Franklin RT, Ganjam VK, et al** - Evaluation of the hypothalamic pituitary-adrenal axis in clinically stressed dogs. *J Am Anim Hosp Assoc***22**:435–42, 1986.
- **Christopoulos S, Bordeau I, Lacroix A** - Clinical and subclinical ACTH-independent macronodular hyperplasia and aberrant hormone receptors. *Horm Res***64**:119–31, 2005.
- **Conner JG, Eckersall PD, Ferguson J, Douglas TA** - Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in Veterinary Science* **45**: 107-110, 1988a.
- **Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A, Aitchison TC, Douglas TA** – Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in Veterinary Science* **44**:

82-88, 1988b.

- **Couto CG, Cerón JJ, Parra MD, Martínez-Subiela S, Iazbik MC** - Acute phase protein concentrations in retired racing Greyhounds. *Vet Clin Pathol* **38**: 219-23, 2009.
- **Cray C, Zaias J, Altman NH** – Acute phase response in animals: a Review. *Comparative Medicine***59**:517-526, 2009.
- **Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, et al** – Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effect of interleukin-1 beta, phorbol ester and corticosteroid. *J Clin Invest***93**: -1101, 1994.
- **Dąbrowski R, Kostro K, Lisiecka U, Szczubiał M, Krakowski L** - Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. *Theriogenology***72**: 471–476, 2009.
- **Dabrowski R, Wawron W, Kostro K** - Changes in CRP, SAA, and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. *Theriogenology***67**: –327, 2007.
- **Dandona P, Chaudhuri A, Mohanty P, et al** –Antiinflammatory effects of insulin. *Curr Opin Clin Nutr***10**: –517, 2007.
- **Das UN** -Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* **17**:953–963, 2001.
- **De Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP, et al.** Hemostatic in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med***17**:674–679, 2003.
- **Dillman RC, Coles EH** - A canine serum fraction analagous to human C-reactive . *Am. J. Vet. Res***27**:1769-1775, 1966.
- **Duesberg CA, Feldman EC, Nelson RW, Bertoy EH, Dublin AB, Reid MH** – Magnetic resonance imaging for diagnosis of pituitary macrotumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **206**: 657-662, 1995.

- **Ebersole J, Cappelli D** – Acute phase reactants in infectious and inflammatory disease. *Periodontology* **23**: 19-49, 2000.
- **Echizen H, Saima S, Ishizaki T** - Disopyramide protein binding in plasma from patients with nephrotic syndrome during the exacerbation and remission phases. *Br J Clin Pharmacol.***24**: 199–206, 1987.
- **Echizen H, Saima S, Umeda N, Ishizaki T** - Protein binding of disopyramide in liver cirrhosis and in nephrotic syndrome. *Clin Pharmacol Ther***40**:274–280, 1986.
- **Eckersall P.D, Duthie S, Safi S, Moffat D, Horagoda NU, Doyle S, Parton R, Bennett D, Fitzpatrick JL** - An automated biochemical assay for haptoglobin: prevention of interference from albumin. *Comp. Haematol. Int.* **5**: 117–124, 1999.
- **Eckersall PD** – Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Medecine Veterinaire* **151**: 577-584, 2000.
- **Eckersall PD, Bell R** – Acute phase pr: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal***185**: 23-27, 2010.
- **Eckersall PD, Conner JG** – Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communications* **12**: 169-178, 1988.
- **Eckersall PD, Conner JG, Harvie J** – An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Vet Res Comm* **15**: 17-24, 1991.
- **Eckersall PD, Duthie S, Toussaint MJ, Gruys E, Heegaard P, Alava M, Lipperheide C, Madec F** - Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Adv Vet Med* **41**: 643-55, 1999.
- **Eckersall PD, Harvey MJ, Ferguson J, Renton JP, Nickson D, Boyd J** - Acute phase proteins in canine pregnancy (). *Journal of Reproduction and Fertility***47**:159–164, 1993.
- **Eckersall PD, Saini PK, McComb C** – The acute phase response of acid-soluble

- glycoprotein, alpha(1)-Acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **51**: 377-385, 1996.
- **Eisele I, Wood IS, German AJ, Hunter L, Trayhurn P.** - gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture. *Hormone Metab Res* **37**:474–81, 2005
 - **Feldman EC** - Treatment of hyperadrenocorticism in dogs. In: Proceedings ACVIM Forum; 2005. p. 672–5.
 - **Feldman EC** – Comparison of ACTH response and dexamethasone suppression as screening tests in canine hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **182**: 506-510, 1983.
 - **Feldman EC, Nelson RW** – Canine Hyperadrenocorticism (Cushing’s Syndrome). In Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. III ed., Saunders, USA, 252-357, 2004.
 - **Feldman EC, Nelson RW, Feldman MS** – Use of low and high-dose dexamethasone test for distinguishing pituitary dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **209**: 772-775, 1996.
 - **Feldman EC, Stabenfeldt GH, Farver TB, Addiego LA** – Comparison of aqueous porcine ACTH with synthetic ACTH in adrenal stimulation tests of female dog. *American Journal of Veterinary Research* **43**: 522-524, 1982.
 - **Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H** - The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in Immunology***23**: 89–96, 2002.
 - **Forrester SD, Troy GC, Dalton MN, et al** – Retrospective evaluation of urinary tract infection in 42 dogs with hyperadrenocorticism or diabetes mellitus or both. *J Vet Int Med* **13**: 557-560, 1999.

- **Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D** - Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* **18**:157–171, 2000.
- **Fransson BA, Karlstam E, Bergstrom A, Lagerstedt AS, Park JS, Evans MA, Ragle CA** - C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* **40**: 391-399, 2004.
- **Fujiki M, Shineha J, Yamanokuchi K, Misumi K, Sakamoto H**- of treatment with polysulfated glycosaminoglycan on serum cartilage oligomeric matrix protein and C-reactive protein concentrations, serum matrix metalloproteinase-2 and -9 activities, and lameness in dogs with osteoarthritis. *AJVR***68**:827-833, 2007.
- **Funder JW** – Glucocorticoid receptors. *J Steroid biochem Mol Biol***43**:389, 1992.
- **Gabay C.** - Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* **8**: 3, 2006.
- **Gabay C, Kushner** - Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine***340**:448–454, 1999.
- **Galac S, Kars VJ, Voorhout G, et al** - ACTH-independent hyperadrenocorticism due to food-dependent hypercortisolemia in a dog: a case report. *Vet J* **177**:141–3, 2008.
- **Galac S, Kooistra HS, Voorhout G, van den Ingh TS, Mol JA, van den Berg G, Meij BP** - Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domestical Animal Endocrinology* **28**: 338-348, 2005.
- **Galezowski AM, Snead EC, Kidney BA, Jackson ML** - C-reactive protein as a prognostic indicator in dogs with acute abdomen syndrome. *J Vet Diagn Invest* **22**: 395-401, 2010.
- **Gallimore MJ, Aasen AO, Smith Erichsen N, et al.** - Plasminogen and functional activities and concentrations of plasmin inhibitors in plasma samples from normal subjects and patients with septic shock. *Thromb Res***18**:601–608, 1980.

- **Ganheim C, Alenius S, Persson Waller K** - Acute phase proteins as indicators of calf herd health. *Vet J* **173**:–651, 2007.
- **Ganrot K** - Plasma protein response in experimental inflammation the dog. *Res Exp Med***161**:251–261, 1973.
- **Gayet C, Bailhache E, Dumon H, Martin L, Siliart B, Nguyen P** - resistance and changes in plasma concentration of TNF, IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *J Anim Physiol Anim Nutr***88**:157–65, 2004.
- **Gebhardt C, Hirschberger J, Rau S, Arndt G, Krainer F, Schweigert FJ, Brunberg L, Kaspers B, Kohn B** - Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* **19**: 450–458, 2009.
- **Gentry PA** – Acute phase proteins. In Loeb WF, Quimby FW, eds. *Clinical Chemistry of Laboratory Animals*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Taylor & Francis pag. 336-398, 1999.
- **German AJ, Hervera M, Hunter L, Holden SL, Morris PJ, Biourge V, Trayhurn P** - in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. *Domestic Animal Endocrinology***37**:214–226, 2009.
- **Giordano A, Spagnolo V, Colombo A, Paltrinieri S** - Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Vet J* **167**: 38-44, 2004.
- **Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A** -Pro-versus anti-inflammatory cytokineprofile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *Journal of Infectious Diseases***181**:176–180, 2000.
- **Greco DS, Peterson ME, Davidson AP, Feldman EC, Komurek K** – Concurrent pituitary and adrenal tumors in dog with hyperadrenocorticism: 17 cases (1978-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **214**: 1349-1353, 1999.

- **Greenfield CL, Walshaw R** - Open peritoneal drainage in the treatment of contaminated peritoneal cavity and septic peritonitis in dogs and cats: 24 cases (1980–1986). *J Am Vet Med Assoc* **191**:100–105, 1987.
- **Griebsch C, Arndt G, Raila J, Florian J, Schweigert FJ, Kohn B** - C-reactive protein concentration in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Vet Clin Pathol* **38**:421–425, 2009.
- **Grooters AM, Bellier DS, Theisen SK, Miyabayashi T** – Ultrasonographic characteristics of the adrenal glands in dog with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: comparison with normal dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **10**: 110-115, 1996.
- **Hansen AE, Schaap MK, Kjelgaard-Hansen M** - Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidimetric immunoassay for determination of feline SAA concentration. *Vet Res Commun* **30**: 863-72, 2006.
- **Hanton G, Sobry C, Daguès N, Provost JP, Le Net JL, Comby P, Chevalier S** - Characterisation of the vascular and inflammatory lesions induced by the PDE4 inhibitor CI-1044 in the dog. *Toxicology Letters* **179**: 15–22, 2008.
- **Harvey, JW, West CL** - Prednisolone-induced increases in serum alpha-2- globulin and haptoglobin concentration in dogs. *Veterinary Pathology* **24**: 90–92, 1987.
- **Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB** - Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg* **26**:393–397, 1997.
- **Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock MI** - Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur J Pharmacol.* **500**: 51-62, 2004.
- **Hayashi S, Jinbo T, Iguchi K, Shimizu M, Shimada T, Nomura M, Ishida Y, Yamamoto S** - A Comparison of the Concentrations of C-reactive Protein and a1-Acid Glycoprotein in the Serum of Young and Adult Dogs with Acute Inflammation. *Veterinary Research Communications* **25**: 117-126, 2001.

- **Haynes RC - Jr:**Adrenocorticotrophic hormone: Adrenocortical steroids and their synthetic analogs: inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In Gilman AG, Rall TW, et al (eds): *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed, p 1445, New York, Pergamon Press, 1990.
- **Heinrich PC, Castell JV, Andus T** – Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical Journal* **265**: 621-636, 1990.
- **Hicks TA, McGlone JJ, Whisnant CS, Kattesh HG, Norman RL** - Behavioral, endocrine, immune and performance measures for pigs exposed to acute stress. *J. Anim. Sci.* **76**: 474–483, 1998.
- **Hillier A, Desch CE** – Large-bodied Demodex mite infestation in 4 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **220**: 623-627, 2002.
- **Hoerauf A, Reusch CE.** Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. *J Am Anim Hosp Assoc***35**:193–9, 1999.
- **Hojo T, Ohno R, Shimoda M et al** – Enzyme and plasma protein induction by multiple oral administrations of phenobarbital at a therapeutic dosage regimen in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* **25**: 121-127, 2002.
- **Holm J, Rozanski E, Freeman L, et al** - C-reactive protein concentrations in canine acute pancreatitis. *J Vet Emerg Crit Care* **14**:183–186, 2004.
- **Holm JL, Rozanski EA, Freeman, LM, Webster CRL** - C-reactive protein in canine acute pancreatitis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* **14**:183–186, 2004.
- **Horadagoda NU, Knox KM, Gibbs HA, Reid SW, Horadagoda A, Edwards SE, Eckersall PD** - Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet Rec* **144**: 437-41, 1999.
- **Hori Y, Indou A, Yamaguchi S, Uechi M** - The time course of C-reactive in a dog

suffering acute pancreatitis. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* **59**:619–622, 2006.

- **Hurley KJ, Sturgess K, Cauvin A, Kuipers R** – The use of Trilostane for the treatment of hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **12**: 210 , 1998.
- **Hurter K, Spreng D, Rytz U, Schawalder P, Ott-Knüsel F, Schmökel H** - Measurements of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *The Veterinary Journal* **169**: 281–285, 2005.
- **Isaac L, Florido MPC, Fecchio D, Singer LM** - Murine alpha--macroglobulin increase during inflammatory responses and tumor growth. *Inflamm Res* **48**:446–452, 1999.
- **Jacoby RC, Owings JT, Ortega T, Gosselin R, Feldman EC** – Biochemical basis for the hypercoagulable state seen in Cushing’s syndrome; discussion 1006-7. *Archives of Surgery* **139**: 1003-1006, 2001.
- **Jergens AE, Crandell J, Morrison JA, Deitz K, Pressel M, Ackermann M, Suchodolski JS, Steiner JM, Evans R** -of Oral Prednisone and Prednisone Combined with Metronidazole for Induction Therapy of Canine Inflammatory Bowel Disease: A Randomized-Controlled Trial. *J Vet Intern Med* **24**: 269–277, 2010.
- **Jergens AE, Schreiner CA, Frank DE, Niyo Y, Ahrens FE, Eckersall PD, Benson TJ, Evans R** - A Scoring Index for Disease Activity in Canine Inflammatory Bowel Disease. *J Vet Intern Med* **17**: 291–297, 2003.
- **Jergens AE, Schreiner CA, Frank DE, Niyo Y, Ahrens FE, Eckersall PD, Benson TJ, Evans R**- A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **17**:291–297, 2003.
- **Johnson KH, Sletten K, Hayden DW, O’Brien TD, Rossow KD, Westermarck P**

- AA amyloidosis in Chinese Shar-pei dogs – immunohistochemical and amino-acid-sequence analyses. *Amyloid. International Journal of Experimental and Clinical Investigation* **2**:92–99, 1995.
- **Jones CA, Refsal KR, Lippert AC, Nachreiner RF, Schwacha MM** - Changes in adrenal cortisol secretion as reflected in the urinary cortisol/creatinine ratio in dogs. *Domestic Animal Endocrinology* **7**: 559-572, 1990.
 - **Kang H** - Retinoic acid and its receptors repress the expression and transactivation functions of Nurr77: a possible mechanism for the inhibition of apoptosis by retinoic acid. *Experimental Cellular Research* **256**: 545–554, 2000..
 - **Kao PC, Shiesh SC, Wu TJ** – Serum C-reactive protein as a marker of wellness assessment. *Am Clin Lab Sci* **36**: 163-169, 2006.
 - **King LG** - Postoperative complications and prognostic indicators in dogs and cats with septic peritonitis: 23 cases (1989–1992). *J Am Vet Med Assoc* **204**: 407–414, 1994.
 - **Kipperman BS, Feldman EC, Dybdal NO, Nelson RW** - Pituitary tumor size, neurologic signs, and relation to endocrine test results in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 43 cases (1980-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **201**: 762-767, 1992.
 - **Kirk GR, Jensen HE** – Toxic effects of o,p'-DDD in the normal dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **11**: 765-768, 1975.
 - **Kjelgaard-Hansen M, Jensen AL, Kristensen AT** - Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol* **32**: 81-7, 2003a.
 - **Kjelgaard-Hansen M, Kristensen AT, Jensen AL** - Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **50**: 164-8, 2003b.

- **Kjelgaard-Hansen M, Luntang-Jensen M, Willesen J, Jensen AL** - Measurement of serum interleukin-10 in the dog. *The Veterinary Journal* **173**:361–365, 2007.
- **Kooistra HS, Galac S** – Recent advances in the diagnosis of Cushing's Syndrome in dogs. *Vet Clin Small Anim* **40**: 259-267, 2010.
- **Korn SH, Koerts-de Lang E, Engel AE et al** – Alpha and beta glucocorticoid receptor mRNA expression in skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **19**: 757-765, 1998..
- **Kovtunova ME, Pan'kov VN, Perevalova NN** – Ceruloplasmin and peptides of medium molecular weight as parameters in development of acute myeloblastic leukemia. *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika* **5**: 52–54, 2003.
- **Krzyzanowski J, Wawron W, Krakowski L, et al.** - A study of unspecific immune mechanisms in bitches with pyometra. *Medycyna Weterynaryjna* **56**: 382-385, 2000.
- **Kuribayashi T, Shimada T, Matsumoto M, Kawato K, Honjyo T, Fukuyama M, Yamamoto Y, Yamamoto S** – Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy Beagle dogs of various ages and pregnant Beagle dogs. *Exp Anim* **52**: 387-390, 2003a.
- **Kuribayashi T, Shimizu M, Shimada T et al** – Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) level in healthy and pregnant beagle dogs. *Exp Anim* **52**: 377-381, 2003b.
- **Lacroix A, N'Diaye N, Tremblay J, et al** - Ectopic and abnormal hormone receptors adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* **22**:75–110, 2001.
- **Lantz GC, Ihle SL, Nelson RW, Carlton WW, Feldman EC, Lothrop CD Jr, Bottoms GD** – Transsphenoidal hypophysectomy in the clinically normal dog. *American Journal of Veterinary Research* **49**: 1134-1142, 1988.
- **Le Coutre P, Kreuzer KA, Na IK, Lupberger J, Holdhoff M, Appelt C, Schwarz M, Muller C, Gambacorti-Passerini C, Platzbecker U, Bonnet R, Ehninger G, Schmidt CA** - Determination of alpha-1 acid glycoprotein in patients with Ph+

- chronic myeloid leukaemia during the first 13 weeks of therapy with STI571. *Blood Cells Molecules & Diseases* **28**: 75–85, 2002.
- **Ledue TB, Rifai N** - Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: Implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin. Chem.* **49**: 1258–1271, 2003.
 - **Lipperheide C, Diepers N, Lampreave F, Alava MA, Petersen B** - Nephelometric determination of haptoglobin plasma concentrations in fattening pigs. *J. Vet. Med. Ser. A* **45**: 543–550, 1998.
 - **Lobetti RG, Möhr AJ, Dippenaar T, Myburgh E** - A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc.* **71**: 38–42, 2000.
 - **Loisa P, Rinne T, Laine S, Hurme M, Kaukinen S** - cytokine response and the development of multiple organfailure in severe sepsis. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica***47**:319–325, 2003.
 - **Lowrie M, Penderis J, Eckersall PD, McLaughlin M, Mellor D, Anderson TJ** - The role of acute phase proteins in diagnosis and management of steroid-responsive meningitis arteritis in dogs. *The Veterinary Journal* **182**: 125–130, 2009a.
 - **Lowrie M, Penderis J, McLaughlin M, Eckersall PD, Anderson TJ** - Steroid Responsive Meningitis – Arteritis: A Prospective Study of Potential Disease Markers, Prednisolone Treatment, and Long-Term Outcome in 20 Dogs (2006 – 2008). *J Vet Intern Med* **23**:862–870, 2009b.
 - **Lu P, Zucker K, Fuller L, Tzakis A, Esquenazi V, Miller J** -Cloning and expression of canine interleukin-10. *Journal of Interferon and Cytokine Research***15**:1103–1109, 1995.
 - **Lulich JP, Osborne CA** – Bacterial infections of the urinary tract. In Ettinger S.J., Feldman E.C. (eds): Textbook of Veterinary Medicine. Philadelphia, WB Saunders, 1994, p 1775.

- **Maddens BEJ, Daminet S, Smets P, et al** - Urinary immunoglobulin , C-reactive protein and retinol-binding protein as candidate early biomarkers for renal dysfunction in dogs with pyometra. *J Vet Intern Med* **22**:, 2008.
- **Mampalam TJ, Tyrrell JB, Wilson CB** - Transphenoidal microsurgery for Cushing's disease: A report of 216 cases. *Annals of Internal Medicine* **109**: 487-493, 1988.
- **Mansfield CS, James FE, Robertson ID** - of a clinical severity index for dogs with acute pancreatitis. *JAVMA* **233**:936-944, 2008
- **Martínez-Subiela S, Cerón JJ** - Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *Can Vet J* **46**: 625-9, 2005.
- **Martinez-Subiela S, Ginel PJ, Ceron JJ**. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Veterinary Record* **154**:814–817, 2004.
- **Martínez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Cerón JJ** – Serum concentrations of acute phase proteins in dog with leishmaniosis. *The Veterinary Record* **150**: 241-244, 2002.
- **Martinez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Ceron JJ**. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* **150**:–244, 2002.
- **Martínez-Subiela, Bernal LJ, Cerón JJ** - Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *AJVR* **64**: 1021-1026, 2003.
- **Mastrorilli C, Dondi F, Agnoli C, et al.** - Clinicopathologic features and outcome predictors of *interrogans australis* infection in dogs: A retrospective study of 20 cases (2001–2004). *J Vet Intern Med* **21**:3–10, 2007.
- **Matijatko V, Kucer N, Baric-Rafaj R, et al.** - CRP concentration in dogs with

uncomplicated babesiosis. In Proceedings of the Third European Colloquium on Acute Phase Proteins [abstract]. Doorn, The Netherlands, 2002.

- **Matijatko V, Mrljak V, Kiš I, Kučer N, Foršek J, Živičnjak T, Romić Ž, Šimec Z, Cerón JJ** - Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology* **144**: 242–250, 2007.
- **McCann TM, Ridyard AE, Else RW, Simpson JW** - of disease activity markers in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Journal of Small Animal Practice* **48**:620–625, 2007.
- **McGrotty YL, Arteaga A, Knottenbelt CM., Ramsey IK., Eckersall PD.**Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. *Veterinary Clinical Pathology***34**: 255–258, 2005.
- **McGrotty YL, Knottenbelt CM, Ramsey IK, Reid SWJ, Eckersall PD** – Haptoglobin concentrations in a canine hospital population. *The Veterinary Record* **152**: 562-564, 2003.
- **McManus PM, Craig LE.** Correlation between leukocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994–1999). *J Am Vet Med Assoc* **218**:1308–1313, 2001.
- **Meij BP, Voorhout G, van den Ingh TS, Hazewinkel HA, Teske E, Rijnberk A** – Results of transsphenoidal hypophysectomy in 52 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Veterinary Surgery* **27**: 246-261, 1998.
- **Merino R, Hurlé JM** - The molecular basis of retinoid action in tumors. *Trends Molecular Medicine* **12**: 508–511, 2003.
- **Merlo A, Rezencle BCG, Franchini ML, Monteiro PRG, Lucas SRR** - Serum amyloid A is not a marker for relapse of multicentric lymphoma in dogs. *Veterinary Clinical Pathology***37**: 79–85, 2008.
- **Merlo A, Rezende BCG, Franchini ML, Simoes DMN, Lucas SRR** – Serum C-

reactive protein concentrations in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **230**: –526, 2007.

- **Mischke R, Waterston M, Eckersall PD**- in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *The Veterinary Journal* **174**:188–192, 2007.
- **Mitchell KD, Kruth SA, Wood RD, Jefferson B** - Acute Phase Protein Concentrations in Dogs with Autoimmune Hemolytic Anemia. *J Vet Intern Med* **23**: 585–591, 2009.
- **Moore KW, de Waal, MR, Coffman, RL, O’Garra, A**- Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* **19**:683–765, 2001.
- **Moule SK, Peak M, Thompson S, Turner GA.** - of the sialylation and microheterogeneity of human serum alpha 1-acid glycoprotein in health and disease. *Clin Chim Acta* **166**:177–185, 1987.
- **Mulnix JA, Rijnberk A, Hendriks HJ** - Evaluation of a modified water-deprivation test for diagnosis of polyuric disorders in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* **169**: 1327-1330, 1976.
- **Murata H, Shimada N, Yoshioka M.** - Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* **168**:–40, 2004.
- **Nakagawa-Tosa N, Morimatsu M, Kawasaki M, Nakatsuji H, Syuto B, Saito M** - Stimulation of haptoglobin synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor, but not by interleukin-1, in bovine primary cultured hepatocytes. *The Journal of Veterinary Medical Science* **57**:219–223, 1995.
- **Nakajima Y, Momotani E, Murakami T, Ishikawa Y, Morimatsu M, Saito M, Suzuki H, Yasukawa K** - Induction of acute phase protein by recombinant human interleukin-6 (IL-6) in calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **35**: 385–391, 1993.
- **Nakamura M, Takahashi M, Ohno K, Koshino A, Nakashima K, Setoguchi A,**

- Fujino Y, Tsujimoto H** - -Reactive Protein Concentration in Dogs with Various Diseases. *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 127–131, 2008.
- **Nakamura M, Takahashi M, Ohno K, Koshino A, Nakashima K, Setoguchi A, Fujino Y, Tsujimoto H.** C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci* **70**:–131, 2008.
 - **Neiger R, Hurley K** – Twenty-four-hour cortisol values in dogs with hyperadrenocorticism on trilostane. *Journal of Small Animal Practice* **42**: 376, 2001.
 - **Nelson AA, Woodard G** - Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE). *Arch Pathol (Chic)* **48**: 387-94, 1949.
 - **Nelson RW, Couto CG** - False pregnancy, disorders of pregnancy, parturition and the postpartum period. In: Nelson RW, Couto CG, eds. *Small Animal Internal Medicine*. 2nd ed. St Louis: Mosby, pag: 881-882, 1998.
 - **Nichols R** - Concurrent illness and complications associated with canine hyperadrenocorticism. *Problems in Veterinary Medicine* **2**: 565-572, 1990
 - **Niebauer GW, Evans SM** – Transsphenoidal hypophysectomy in the dog: A new technique. *Veterinary Surgery* **17**: 296-303, 1988.
 - **Niewold TA, Van der Linde-Sipman J, Murphy C, Tooten PCJ, Gruys E** – amyloidosis in cats: Siamese and Abyssinian AA proteins differ in primary sequence and pattern of deposition. *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders***6**:205–209, 1999.
 - **Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP** - Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat. Rev., Drug Discov.***3**:27–41, 2004.
 - **Ogilvie GK, Walters LM, Greeley SG, Henkel SE, Salman MD** - Concentration of -acid acid glycoprotein in dogs with malignant neoplasia. *Journal of the*

American Veterinary Medical Association **203**:1144–1146, 1993.

- **Ohno K, Yokoyama Y, Nakashima K, Setoguchi A, Fujino Y, Tsujimoto H** – C-reactive protein concentration in Canine Idiopathic Polyarthrits. *J Vet Med Sci* **68**:1275-1279, 2006.
- **Ortega TM, Feldman EC, Nelson RW, et al** – Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinin ratio in dogs with hyperadrenocorticism, *J Am Vet Med Ass* **209**: 1724-1729, 1996.
- **Otto CM**. Sepsis, In: Wingfield WE. ed. *The Veterinary ICU Book*. Jackson Hole, WY: Teton NewMedia; 2002, pp. 695–709.
- **Páez-Pareda M, Kovalovsky D, Hopfner U, Theodoropoulou M, Pagotto U, Uhl E, Losa M., Stalla J, Grübler Y, Missale C, Arzt E, Stalla G** – Retinoic acid prevents experimental Cushing’s syndrome. *Journal Clinical Investigation* **108**:1123–1131, 2001.
- **Paradowski M, Lobos M, Kuydowicz J, et al.** - Acute phase proteins in serum and cerebrospinal fluid in the course of bacterial meningitis. *Clin Biochem* **28**:459–466, 1995.
- **Paramo JA, Rodriguez JA, Orbe J** – Fibrinogen. An old hemostatic protein with a new function: non-invasive marker of subclinical atherosclerosis. *Medicina Clinica* **124**: 790-794, 2005.
- **Parra MD, Cerón JJ** - Effects of haemolysis, lipaemia and bilirubinaemia in canine C-reactive protein and haptoglobin determination by time-resolved fluorometry: short communication. *Acta Vet Hung* **55**: 295-9, 2007.
- **Parra MD, Papasouliotis K, Cerón JJ** - Concentrations of C-reactive protein in effusions in dogs. *Veterinary Record* **158**:757, 2006.
- **Parra MD, Tecles F, Martínez-Subiela S, Cerón JJ** - C-reactive protein measurement in canine saliva. *J Vet Diagn Invest* **17**: 139–144, 2005.

- **Parra MD, Tuomola M, Cabezas-Herrera J, Cerón JJ** - Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Vet Res Commun* **30**: 113-26, 2006.
- **Parra MD, Väisänen V, Cerón JJ** – Development of a time-resolved fluorometry based immunoassay for the determination of canine haptoglobin in various body fluids. *Vet Res* **36**: 117-129, 2004.
- **Pedersen LM, Sorensen PG** - Mediators of inflammation correlate with microalbuminuria in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology* **121**: 275–279, 2003.
- **Pepys MB, Baltz ML** – Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A protein. *Advance in Immunology* **34**: 141-212, 1983.
- **Petersen HH, Dideriksen D, Christiansen BM, Nielsen JP** - Haptoglobin serum concentration as marker of clinical signs in finishing pigs. *Vet. Rec.* **151**: 85–89, 2002.
- **Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM** - Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* **35**:–187, 2004.
- **Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH** – Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* **35**: 163-187, 2004.
- **Petersen HH, Nielsen JP, Jensen AL, Heegaard PMH** - Evaluation of an Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) for Determination of Porcine Haptoglobin, *J.Vet. Med. Ser. A* **48**: 513–523, 2001.
- **Petersen HH, Nilesen JP, Heegaard PM** - Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research***35**:163–187, 2004.
- **Peterson ME** - Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Clin Tech Small Anim*

Pract **22**: –11, 2007.

- **Peterson ME** – Hyperadrenocorticism. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **14**: 731-749, 1984.
- **Peterson ME** - Medical treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs: should L-deprenyl (Anipryl) ever be used? *J Vet Intern Med* **13(4)**: 289-90, 1999.
- **Peterson ME, Gilbertson SR, Drucker WD** - Plasma cortisol response to exogenous ACTH in 22 dogs with hyperadrenocorticism caused by adrenocortical neoplasia. *J Am Vet Med Assoc* **180**:542–4, 1982.
- **Planellas M, Bassols A, Siracusa C, Saco Y, Gimenez M, Pato R, Pastor J** - of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. *Veterinary Clinical Pathology* **38**:348–352, 2009.
- **Polonovski M, Jayle MF** - Peroxydases animales. Leur spécificité et leur role biologique, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 66–91, 1939.
- **Potts GO, Creange JE, Hardomg HR, et al.** - Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis. *Steroids* **32**: 257-267, 1978.
- **Prantera C, Davoli M, Lorenzetti F, et al** - Clinical and laboratory of extent of ulcerative colitis. Serum C-reactive protein helps the most. *J Clin Gastroenterol* **10**:41–50, 1988.
- **Putnam F.W** - Haptoglobin, in: Putnam F.W. (Ed.), *The plasma proteins*, Academic Press, 1975.
- **Raida MK, Buchmann K** - Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri*. *Dev Comp Immunol* **33**:–45, 2009.
- **Ramsey IK** – Trilostane in dogs. *Vet Clin Small Anim* **40**: 269-283, 2010.
- **Reine NJ** – Medical manegment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism:

Mitotane versus trilostane. *Clin Tech in Small Animal Practice* **22**: 18-25, 2007.

- **Reusch CE, Steffen T, Hoerauf A** - The efficacy of L-deprenyl in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* **13**: 291–301, 1999.
- **Reusch CE** - Hyperadrenocorticism. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine, 6th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2005, pp.1592-1612.
- **Reusch CE, Feldman EC** – Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **5**: 3-10, 1991.
- **Richter H** - Haptoglobin bei Haussäugetieren, III. Mitteilung: Der Haptoglobingehalt im Blutplasma und -serum von Widerkäufern und Schweinen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen. *Arch. Exp. Vetmed.* **28**: 505–519, 1974.
- **Rijnberk A, van Wees A, Mol JA** - Assessment of two tests for the diagnosis of canine hyperadrenocorticism, *The Veterinary Record* **122**:178-180, 1988.
- **Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, Iqbal Z, Kociba G, Mott J, Chichanasiriwithaya W** C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with Ehrlichia canis. *J Clin Microbiol* **32**: 912-7, 1994.
- **Riley RF, Coleman MK** - Isolation of C-reactive proteins of man, monkey, rabbit and by affinity chromatography on phosphorylated cellulose. *Clin. Chim. Acta* **30**:483-49, 1970.
- **Riley RF, Zontine W** - Further observations on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. *J Lab Clin Med* **80**: 698-703, 1972.
- **Ristimaki A, Narko K, Hla T** – Down-regulation of cytokine-induced cyclooxygenase-2 transcript isoform by dexamethasone: Evidence of post-transcriptional

regulation. *Biochemical J* **318**: 325-331, 1996.

- **Robey FA, Jones KD, Steinberg AD** - C-reactive protein mediates the solubilization of nuclear DNA by complement in vitro. *J Exp Med* **161**: 1344-56, 1985.
- **Ruckstuhl NS, Nett CS, Reusch CE** – Results of clinical examinations, laboratory tests, and ultrasonography in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *American Journal of Veterinary Research* **63**: 506-512, 2002
- **Samokyszyn VM, Miller DM, Reif DW, Aust SD** – Inhibition of superoxide and ferritin dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 21-26, 1989.
- **Sasaki K, Ma Z, Khatlani TS, Okuda M, Inokuma H, Onishi T** - Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. *J Vet Med Sci* **65**: 545-8, 2003.
- **Schetters ThPM, Kleuskens JAGM, Van De Crommert J, De Leeuw PWJ, Finizio AL, Gorenflot A** - Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. *Veterinary Parasitology* **162**: 7–15, 2009.
- **Schimmer BP, Parker K** – ACTH: adrenocorticosteroid and their synthetic analogues. In Hardman JG, Limbird LE (eds): Goodman and Gilman's. The pharmacological Basis of Therapeutics 9th ed, pp 1465-1485, New York, Mc Graw Hill, 1995.
- **Scott DW, et al.** – Endocrine and Metabolic Disease. In Muller G.H., Kirk R.W. Small Animal Dermatology, 6th ed., W.B. Saunders company, Philadelphia. **1**: 780-885, 2001.
- **Scott-Moncrieff JC, Treadwell NG, McCullough SM, Brooks MB** – Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *J Am Anim Hosp Assoc* **37**:220–227, 2001.

- **Sellmayer A, Limmert T, Hoffmann U** - High sensitivity C-reactive protein in cardiovascular risk assessment – CRP mania or useful screening? *Int. Angiol.* **22**: 15–23, 2003.
- **Shimada T, Ishida Y, Shimizu M, Nomura M, Kawato K, Iguchi K, Jinbo T.** - Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Vet Res Commun.* **26**: 171-177, 2002.
- **Siracusa C, Manteca X, Cerón J, et al.** - Perioperative stress response dogs undergoing elective surgery: variations in behavioral, neuroendocrine, immune and acute phase responses. *Anim Welf* **17**: 259–273, 2008.
- **Siracusa C, Manteca X, Cuenca R, Alcalá M, Alba A, Lavín S, Pastor J** - of a synthetic appeasing pheromone on behavioral, neuroendocrine, immune, and acute-phase perioperative stress responses in dogs. *JAVMA* **237**:673-681, 2010.
- **Skinner JG** - International standardization of acute phase proteins. *Vet Clin Pathol* **30**: 2–7, 2001.
- **Smets PMY, Meyer E, Maddens BEJ, Duchateau L, Daminet S** - Markers in Healthy Young and Aged Dogs and Dogs with Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med* **24**: 65–72, 2010.
- **Smith S.** Hemostatic complications of canine IMHA. Proceedings of the 25th ACVIM Forum, Seattle, WA, 2007.
- **Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T** - *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology* **157**: 211–221, 2008.
- **Solter PF, Hoffmann WE, Hugerford LL, Siegel JP, St Denis SH, Dorner JL** - Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *American Journal of Veterinary Research* **52**: 1738-1742, 1991.

- **Solter PF, Hoffmann WE, Hungerford LL, Peterson ME, Dorner JL** – Assessment of corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **203**: 534-538, 1994.
- **Tagata K, Yokoyama S, Ginbo T, Honda M, Okimura T, Odakura M, Nomura M, Yamamoto S** - Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. *Vet Res Commun* **20**: 21-30, 1996.
- **Tecles F, Caldin M, Zanella A, Membiela F, Tvarijonaviciute A, Martínez Subiela S, Cerón JJ** - Serum acute phase protein concentrations in female dogs with mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* **21**: 214–219, 2009.
- **Tecles F, Spiranelli E, Bonfanti U, Ceron JJ, Paltrinieri S** – Preliminary of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **19**:865–870, 2005.
- **Teske E, Rothuizen J, de Bruijne JJ, Rijnberk A** – Corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme in the diagnosis of canine hypercorticism. *The Veterinary Record* **125**: 12-14, 1989.
- **Tillet, WS, Francis T** -Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exper. Med* **52**:561-571, 1930.
- **Tipold A** - Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: A retrospective study. *J Vet Intern Med* **9**: 304–314, 1995.
- **Tosa N, Morimatsu M, Nakagawa M, et al.** - Purification and identification of a serum protein increased by anthelmintic drugs for *Dirofilaria immitis* in dogs. *J Vet Med Sci* **55**: 27–31, 1993.
- **Tsuchiya R, Akutsu Y, Ikegami A, Scott MA, Neo S, Ishikawa T, Hisasue M, Yamada T** - and Inflammatory Effects of Intravenous Administration of Human Immunoglobulin G in Dogs. *J Vet Intern Med* **23**:1164–1169, 2009.

- **Uhlar CM, Whitehead AS** - Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem.* **265**: 501-23, 1999.
- **Ulutas B, Bayramli G, Ulutas PA, Karagenc T.** Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Vet Clin Pathol***34**:–147, 2005.
- **Vanden Bossche H, Willemsens G, Bellens D, Roels I, Janssen PA** – From 14a-demethylase inhibitors in fungal cells to androen and estrogen biosynthesis inhibitors in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions* **18**: 10-13, 1990.
- **Vannucchi CI, Mirandola RM, Oliveira CM** - Acute-phase protein profile during gestation and diestrous: proposal for an early pregnancy test in bitches. *Animal Reproduction Science***74**:87–99, 2002.
- **Veiga AP, Price CA, de Oliveira ST, Dos Santos AP, Campos R, Barbosa PR, González FH** - Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein. *J Vet Diagn Invest* **20**: 224–228, 2008.
- **Virkki R, Juven T, Rikalainen H, et al.** - Differentiation of bacterial and viral pneumonia in children. *Thorax***57**:438–441, 2002.
- **Voorhout G, Rijnberk A, Sjollema BE, et al** - Nephrotomography and ultrasonography for the localization of hyperfunctioning adrenocortical tumors in dogs. *Am J Vet Res***51**:1280–5, 1990.
- **Watanabe M, Oikawa T, Hiraoka H, Kaneko N, Itamoto K, Mizuno T, Okuda M, Inokuma H** - Experimental inoculation of beagle dogs with Ehrlichia species detected from Ixodes ovatus. *Veterinary Parasitology* **136**: 147–154, 2006.
- **Weidmeyer CE, Solter PE** – Validation of human haptoglobin immunoturbidimetric detection of haptoglobin in equine and canine serum and plasma. *Vet Clin Pathl* **25**:141-146, 1996.
- **Wieland A, Kerbl R, Berghold A, Schwinger W, Mann G, Urban C** - C-reactive

protein (CRP) as tumour marker in pediatric and adolescent patients with Hodgkin disease. *Medical and Pediatric Oncology* **41**: 21–25, 2003.

- **Woloski, BM, Smith, EM, Meyer, WJ, Fuller, GM, Blalock, JE** - Corticotropin-releasing activity of monokines. *Science***230**: 1035-7, .
- **Womack J, Tien PC, Feldman J, et al** - Obesity immune cell counts in women. *Metabolism***56**:998–1004, 2007.
- **Yamamoto S, Miyaji S, Ashida Y, Otabe K, Momotani E, Rikihisa Y** - Preparation of anti-canine serum amyloid A (SAA) serum and purification of SAA from canine high-density lipoprotein. *Vet Immunol Immunopathol* **41**: 41-53, 1994.
- **Yamamoto S, Shida T, Honda M, Ashida Y, Rikihisa Y, Odakura M, Hayashi S, Nomura M, Isayama Y** - Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with Bordetella Bronchiseptica (Phase 1 Cells). *Veterinary Research Communications* **18**: 347-357, 1994.
- **Yamamoto S, Shida T, Miyaji S, Santsuka H, Fujise H, Mukawa K, Furukawa E, Nagae T, Naiki M** - Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet Res Commun* **17**: 85-93, 1993.
- **Yang TH, Hutchinson P, Santos LL, et al** – Glucocorticoid inhibition of adjuvant arthritis synovial macrophage nitric oxide production: role of lipocortin. *J Clin Exp Immunol* **111**: 117-122, 1998.
- **Yuki M, Itoh H, Takase K** - Serum alpha-1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. *Vet Clin Pathol* **39**: 65-71, 2010.
- **Yuki M, Itoh H, Tamura K, Nishii N, Takase K.** - Isolation, characterization and quantitation of canine alpha-1-acid glycoprotein. *Vet Res Commun.***32**:533–542, 2008.
- **Yuki M, Machida N, Sawano T, Itoh H** - Investigation of serum concentrations

and immunohistochemical localization of α 1-acid glycoprotein in tumor dogs. *Vet Res Commun* **35**: 1-11, 2011.

- **Yule TD, Roth MB, Dreier K, Johnson AF, Palmer-Densmore M, Simmons K, Fanton R**- Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. *Vaccine***15**:720–729, 1997.
- **Zeugswetter F, Hoyer MT, Pagitz M, et al** - desmopressin stimulation test in dogs with Cushing's syndrome. *Domest Anim Endocrinol***34**:254–60, 2008.

Indice generale

| | |
|--|----|
| | 1 |
| Introduzione..... | 2 |
| CAPITOLO 1..... | 4 |
| La risposta di fase acuta..... | 4 |
| 1.1 INTRODUZIONE..... | 4 |
| 1.2 LA RISPOSTA DI FASE ACUTA (APR)..... | 4 |
| 1.2.1 REAZIONE LOCALE e SISTEMICA..... | 6 |
| 1.2.2 LE CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE..... | 7 |
| 1.2.2.1 L'interleuchina-6 (IL-6)..... | 8 |
| 1.2.2.2 L'interleuchina-10 (IL-10)..... | 9 |
| 1.2.3 VARIAZIONI METABOLICHE..... | 10 |
| 1.3 LE PROTEINE DI FASE ACUTA..... | 10 |
| 1.3.1 FUNZIONI BIOLOGICHE..... | 11 |
| 1.3.2 MAGNITUDO E CINETICA..... | 11 |
| 1.3.3 DIFFERENZE DI SPECIE..... | 13 |
| 1.3.4 INFLUENZA DI RAZZA E SESSO..... | 14 |
| 1.3.5 INFLUENZA DELL'ETÁ..... | 14 |
| 1.3.6 INFLUENZA DELL'OBESITÁ..... | 15 |
| 1.3.7 INFLUENZA DELLO STRESS..... | 16 |
| 1.3.8 INFLUENZA DELLA GRAVIDANZA..... | 17 |
| 1.4 ELETTROFORESI SIERICA..... | 17 |
| CAPITOLO 2..... | 19 |
| Caratteristiche delle APPs..... | 19 |
| 2.1 INTRODUZIONE..... | 19 |
| 2.2 PROTEINE DI FASE ACUTA POSITIVE..... | 19 |
| 2.2.1 PROTEINA C-REATTIVA (CRP)..... | 20 |
| 2.2.1.1 Caratteristiche della molecola..... | 21 |
| 2.2.1.2 Funzione biologica..... | 21 |
| 2.2.1.3 Cinetica e Magnitudo..... | 22 |
| 2.2.1.4 Metodiche di laboratorio..... | 22 |
| 2.2.1.5 Fattori che ne influenzano la misurazione..... | 23 |
| 2.2.1.6 CRP su altri substrati..... | 24 |
| 2.2.2 APTOGLOBINA (Hp)..... | 26 |
| 2.2.2.1 Caratteristiche della molecola..... | 26 |
| 2.2.2.2 Funzioni biologiche..... | 26 |
| 2.2.2.3 Cinetica e Magnitudo..... | 27 |
| 2.2.2.4 Metodiche di laboratorio..... | 28 |
| 2.2.2.5 Fattori che ne influenzano la misurazione..... | 28 |
| 2.2.3 α -1 GLICOPROTEINA ACIDA (AGP)..... | 29 |
| 2.2.3.1 Caratteristiche della molecola..... | 29 |
| 2.2.3.2 Funzione biologica..... | 30 |
| 2.2.3.3 Cinetica e Magnitudo..... | 30 |
| 2.2.3.4 Metodiche di laboratorio..... | 30 |
| 2.2.4 SEROAMILOIDE-A (SAA)..... | 31 |

| | | |
|--|---|----|
| 2.2.4.1 | Caratteristiche della molecola..... | 31 |
| 2.2.4.2 | Funzione biologica..... | 31 |
| 2.2.4.3 | Cinetica e Magnitudo..... | 31 |
| 2.2.4.4 | Metodiche di laboratorio..... | 32 |
| 2.2.5 | FIBRINOGENO..... | 32 |
| 2.2.5.1 | Caratteristiche della molecola..... | 32 |
| 2.2.5.2 | Funzione biologica..... | 33 |
| 2.2.5.3 | Cinetica e Magnitudo..... | 33 |
| 2.2.5.4 | Metodiche di laboratorio..... | 33 |
| 2.2.6 | CERULOPLASMINA..... | 34 |
| 2.2.6.1 | Caratteristiche della molecola..... | 34 |
| 2.2.6.2 | Funzione biologica..... | 34 |
| 2.2.5.3 | Cinetica e Magnitudo..... | 34 |
| 2.2.5.4 | Metodiche di laboratorio..... | 35 |
| 2.3 | PROTEINE DI FASE ACUTA NEGATIVE..... | 35 |
| 2.3.1 | ALBUMINA..... | 35 |
| 2.3.2 | TRANSFERRINA..... | 36 |
| CAPITOLO 3..... | | 37 |
| Applicazione clinica delle APPs..... | | 37 |
| 3.1 | INTRODUZIONE..... | 37 |
| 3.2 | APPs nei PROCESSI NEOPLASTICI..... | 38 |
| 3.2.1 | NEOPLASIE EMATOPOIETICHE..... | 38 |
| 3.2.2 | NEOPLASIE MAMMARIE..... | 39 |
| 3.3 | APPs nei PROCESSI IMMUNOMEDIATI..... | 40 |
| 3.3.1 | MENINGITE ARTERITE STEROIDO-RESPONSIVA..... | 40 |
| 3.3.2 | ANEMIA EMOLITICA AUTOIMMUNE (AIHA)..... | 41 |
| 3.3.3 | POLIARTRITE IDIOPATICA CANINA..... | 41 |
| 3.4 | APPs nelle PATOLOGIE su BASE INFETTIVA..... | 42 |
| 3.4.1 | BABESIOSI CANINA..... | 43 |
| 3.4.2 | EHRlichiosi CANINA..... | 43 |
| 3.4.3 | LESHMANIOSI CANINA..... | 44 |
| 3.5 | APPs nelle PATOLOGIE su BASE INFIAMMATORIA..... | 45 |
| 3.5.1 | SIRS e SEPSI..... | 45 |
| 3.5.2 | PIOMETRA..... | 46 |
| 3.5.3 | INFIAMMAZIONI GASTROINTESTINALI..... | 47 |
| 3.5.4 | PANCREATITE..... | 48 |
| 3.6 | APPs nella GRAVIDANZA..... | 49 |
| 3.7 | INFLUENZA dei FARMACI sulle APPs..... | 49 |
| 3.7.1 | CORTICOSTEROIDI..... | 49 |
| 3.7.2 | FANS..... | 51 |
| 3.8 | APPs nelle PATOLOGIE ENDOCRINE..... | 52 |
| 3.8.1 | IPERCORTISOLISMO..... | 52 |
| 3.9 | QUANDO le APPs NON SONO UTILI..... | 54 |
| 3.10 | PROFILI di APPs..... | 55 |
| CAPITOLO 4..... | | 56 |
| Corticosteroidi Endogeni ed Esogeni..... | | 56 |

| | |
|---|----|
| nel cane..... | 56 |
| 4.1 INTRODUZIONE..... | 56 |
| 4.2 IPERCORTISOLISMO SPONTANEO..... | 56 |
| 4.2.1 EPIDEMIOLOGIA..... | 57 |
| 4.2.2 EZIOPATOGENESI..... | 57 |
| 4.2.2.1 Forma ipofisaria o Pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH)..... | 58 |
| 4.2.2.2 Produzione ectopica di ACTH..... | 58 |
| 4.2.2.3 Forma surrenalica o Adrenal-dependent hyperadrenocorticism (ADH)..... | 59 |
| 4.2.3 SEGNI CLINICI..... | 59 |
| 4.2.4 ESAMI di LABORATORIO..... | 62 |
| 4.2.4.1 Esame Emocromocitometrico..... | 62 |
| 4.2.4.2 Profilo Biochimico..... | 62 |
| 4.2.4.3 Esame chimico-fisico delle urine..... | 63 |
| 4.2.5 DIAGNOSI..... | 63 |
| 4.2.5.1 Test di Stimolazione con ACTH..... | 64 |
| 4.2.5.2 Test di soppressione con desametasone a basse dosi (LDDSt)..... | 65 |
| 4.2.5.3 Test di soppressione con desametasone ad alte dosi (HDDSt)..... | 66 |
| 4.2.5.4 Rapporto Cortisolo urinario/Creatinina (UC:CR)..... | 67 |
| 4.2.5.5 Test con la Desmopressina (DDAVP)..... | 68 |
| 4.2.5.6 Ecografia addominale..... | 68 |
| 4.2.5.7 Tomografia computerizzata..... | 69 |
| 4.2.6 TERAPIA..... | 69 |
| 4.2.6.1 Terapia del Pituitary -Dependent Hyperadrenocorticism (PDH)..... | 70 |
| 4.2.6.2 Terapia dell'ADH..... | 72 |
| 4.3 IPERCORTISOLISMO IATROGENO..... | 73 |
| 4.3.1 MECCANISMI D'AZIONE..... | 74 |
| 4.3.2 EFFETTI FISIOLÓGICI..... | 76 |
| 4.3.2.1 Effetti sul metabolismo intermedio: carboidrati, proteine e lipidi..... | 76 |
| 4.3.2.2 Equilibrio idrico ed elettrolitico..... | 77 |
| 4.3.2.3 Sistema emolinfatico..... | 78 |
| 4.3.2.4 Effetti antiinfiammatori ed immunosoppressivi..... | 79 |
| 4.3.2.5 Sistema cardiovascolare..... | 81 |
| 4.3.2.6 Ossa e cartilagine..... | 81 |
| 4.3.2.7 Muscolo scheletrico..... | 81 |
| 4.3.2.8 Sistema nervoso centrale..... | 82 |
| 4.3.2.9 Apparato gastroenterico..... | 82 |
| 4.3.3 FARMACOCINETICA dei CORTICOSTEROIDI..... | 82 |
| 4.3.3.1 Distribuzione e metabolismo..... | 83 |
| 4.3.3.2 Preparazioni farmaceutiche..... | 83 |
| PARTE SPERIMENTALE..... | 85 |
| CAPITOLO 5..... | 85 |
| MATERIALI e METODI..... | 85 |
| 5.1 INTRODUZIONE..... | 85 |
| 5.2 MATERIALI e METODI..... | 86 |
| 5.2.1 SELEZIONE DEI SOGGETTI CON IPERCORTISOLISMO SPONTANEO..... | |

| | |
|---|-----|
| | 86 |
| 5.2.2 SELEZIONE DEI SOGGETTI AFFETTI DA ALTRE PATOLOGIE..... | 88 |
| 5.2.3 SELEZIONE DEI SOGGETTI SANI..... | 89 |
| 5.2.4 COLLEZIONE E STOCCAGGIO DEI CAMPIONI..... | 89 |
| 5.3 DETERMINAZIONI DELLE APPs..... | 89 |
| 5.3.1 PROTEINA C-REATTIVA (CRP)..... | 90 |
| 5.3.2 APTOGLOBINA (Hp)..... | 91 |
| 5.4 ANALISI STATISTICA..... | 93 |
| CAPITOLO 6..... | 94 |
| Risultati..... | 94 |
| 6.1 IPERCORTISOLISMO SPONTANEO (Gruppo 1)..... | 94 |
| 6.1.1 CRP E Hp IN CANI CON IPERCORTISOLISMO SPONTANEO..... | 96 |
| 6.1.2 CRP e Hp DURANTE LA TERAPIA CON TRILOSTANO..... | 97 |
| 6.2 SOGGETTI AFFETTI DA ALTRE PATOLOGIE NON SINDROME DI CUSHING..... | 101 |
| 6.3 GRUPPO DEI SOGGETTI SANI..... | 103 |
| 6.4 ANALISI STATISTICA DEI DATI | 105 |
| 6.4.1 CANI CON SINDROME DI CUSHING PRE E POST TRATTAMENTO..... | 105 |
| 6.4.2 CANI MALATI NON-SINDROME DI CUSHING PRE E POST TRATTAMENTO..... | 105 |
| 6.4.3 CONFRONTO FRA I GRUPPI..... | 106 |
| CAPITOLO 7..... | 109 |
| Discussione e Conclusioni..... | 109 |
| 7.1 CRP e HP NEI SOGGETTI CON SINDROME DI CUSHING..... | 109 |
| 7.2 CRP e HP DOPO IL TRILOSTANO..... | 112 |
| 7.3 CRP e HP NEI MALATI NON-SINDORME DI CUSHING..... | 112 |
| 7.4 CRP E HP DOPO I CORTICOSTEROIDI ESOGENI..... | 114 |
| 7.5 DIFFERENZE TRA I GRUPPI..... | 114 |
| 7.6 CONCLUSIONI..... | 116 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 117 |