

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Veterinarie

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4

Settore Scientifico disciplinare: Vet/08

TITOLO TESI

*Sindrome di Cushing nel cane: nuove prospettive
diagnostiche e terapeutiche*

¹_____

Presentata da: ***Dott.ssa Sara Corradini***

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Carlo Tamanini

Dott. Federico Fracassi

Esame finale anno 2014

Indice

Capitolo 1	Obiettivi e scopi della tesi	3
<i>Parte 1: Aspetti eziopatogenetici, clinici, diagnostici e di trattamento terapeutico nella sindrome di Cushing del cane</i>		
Capitolo 2	La sindrome di Cushing nel cane: eziopatogenesi, sintomatologia e diagnosi	8
Capitolo 3	Terapia medica della sindrome di Cushing nel cane	29
<i>Parte 2: Nuove prospettive diagnostiche e di monitoraggio nella sindrome di Cushing del cane</i>		
Capitolo 4	Valutazione del cortisolo nel pelo nella diagnosi di ipercortisolismo nel cane	45
Capitolo 5	Valutazione del cortisolo basale per il monitoraggio della terapia con trilostano in cani affetti da ipercortisolismo spontaneo	57
<i>Parte 3: Fattori prognostici in cani con PDH e un caso di macroadenoma ipofisario sottoposto a ipofisectomia transfenoidale</i>		
Capitolo 6	Fattori prognostici alla diagnosi in cani affetti da ipercortisolismo ipofisi-dipendente	61
Capitolo 7	Ipofisectomia transfenoidale in un cane con ipercortisolismo da macroadenoma ipofisario	79
Capitolo 8	Discussioni e conclusioni	96

Capitolo 1

OBIETTIVI E SCOPI DELLA TESI

La Sindrome di Cushing (SC) o ipercortisolismo è una delle più frequenti endocrinopatie del cane. In circa l'80-85% dei casi, l'ipercortisolismo è conseguente ad una ipersecrezione di ormone adrenocorticotropo (ACTH) secondario alla presenza di un adenoma ipofisario; tale forma è chiamata ACTH dipendente o pituitary dependent hypercortisolism (PDH). Nei rimanenti casi si tratta invece di una forma ACTH non dipendente, legata ad una eccessiva secrezione di glucocorticoidi da parte di una neoformazione surrenalica benigna o maligna (AT, adrenocortical tumors). Forme meno comuni, descritte in medicina umana e sporadicamente in medicina veterinaria sono rappresentate dall'espressione recettori aberranti a livello corticosurrenalico (es. Sindrome di Cushing alimento-dipendente) e dalla secrezione ectopica di ACTH.

La diagnosi di SC deve sempre comprendere anamnesi, sintomi clinici, test endocrini dinamici specifici e diagnostica per immagini. Effettuare un protocollo diagnostico completo in soggetti con sintomatologia caratteristica della patologia aumenta notevolmente la sensibilità e la specificità dei test endocrini. Nel **Capitolo 2** verranno discussi gli aspetti eziopatogenetici, clinici, sintomatologici e diagnostici della Sindrome di Cushing nel cane.

Le opzioni terapeutiche in corso di SC sono sia di tipo chirurgico che medico, e dipendono dalla sede dell'ipercortisolismo (ipofisario vs surrenalico). La scelta del trattamento deve inoltre considerare eventuali patologie concomitanti, la presenza di metastasi e la compliance del proprietario. Per quanto riguarda le opzioni mediche, nel corso degli anni sono stati studiati differenti principi attivi con diversi meccanismi d'azione, il cui scopo è ridurre la secrezione di cortisolo e di conseguenza risolvere i sintomi clinici connessi allo stato ipercortisolemico. Il mitotano e il trilostano sono attualmente i due principi attivi più efficaci e utilizzati nel cane .

L'unico principio attivo registrato in medicina veterinaria Italia è il trilostano (Vetoryl®), un inibitore enzimatico della 3-β idrossisteroide-deidrogenasi (3β-HSD), un enzima

coinvolto nella steroidogenesi a livello di conversione del pregnenolone in progesterone nella corticale surrenalica. Il trilostano, pertanto, limita la produzione di progesterone, del 17- α OH progesterone e dei prodotti finali che si formano a partire dal pregnenolone, quali il cortisolo e in minor misura l'aldosterone. Nel **Capitolo 3** sono discussi i principi attivi più e meno comunemente utilizzati in corso di SC del cane.

Da un punto di vista diagnostico, sia in medicina umana che in medicina veterinaria si è costantemente alla ricerca di test diagnostici attendibili e possibilmente poco invasivi. Il cortisolo, in particolare, è fortemente condizionato dalle variazioni ambientali e dalle operazioni di contenimento necessarie per un prelievo di sangue. Lo studio degli steroidi in tricologia è già ampiamente praticato in medicina umana. Il pelo, come campione biologico risulta infatti particolarmente interessante in quanto il cortisolo ematico viene incorporato all'interno del pelo durante la fase di crescita. Le HCC (hair cortisol concentrations, HCC) rispecchiano le concentrazioni su un arco temporale maggiore e non sono influenzate dalle variazioni giornaliere legate a fattori stressanti. Per questa ragione abbiamo deciso di effettuare uno studio simile nel cane, valutando il pelo come matrice per la determinazione dei livelli di cortisolo. Sono stati utilizzati 22 cani con SC al momento della diagnosi, 28 cani con patologie croniche (sick control dogs, SCD) ma senza SC e 40 cani sani (**Capitolo 4**).

Nei cani con SC sottoposti a terapia medica con trilostano, l'efficacia terapeutica è valutata sulla base della risoluzione della sintomatologia clinica associata alla risposta al test di stimolazione con ACTH. Tale esame consiste nella valutazione del cortisolo basale (T0) e 1 ora post stimolazione con ACTH (T1). Lo scopo di tale test è quello di valutare la presenza di una riserva surrenalica nel picco di massima azione del farmaco, ovvero a 2-3 ore dalla somministrazione. Gli svantaggi legati all'utilizzo di questo test includono la necessità di eseguire 2 prelievi e recentemente anche la difficoltà di reperire l'ACTH sintetico (Synachten®) sia in Europa che negli Stati Uniti. Pertanto abbiamo condotto uno studio al

fine di valutare se i livelli di cortisolo basale (T0) possano essere utili ed eventualmente sostituirsi al test di stimolazione con ACTH per il monitoraggio terapeutico di cani con SC in terapia con trilostano(**Capitolo 5**).

Gli studi presenti in letteratura sulla SC del cane si focalizzano in gran parte sugli aspetti eziopatogenetici, clinici e terapeutici; scarse sono invece le informazioni presenti da un punto di vista prognostico per i soggetti sottoposti a terapia medica con trilostano. Ottenere informazioni più precise riguardo ai fattori prognostici nei soggetti con PDH garantirebbe indicazioni più precise da poter fornire al proprietario migliorandone quindi la motivazione ad intraprendere il trattamento terapeutico. Con l'obiettivo di valutare il valore prognostico sul tempo di sopravvivenza delle diverse variabili cliniche e laboratoristiche valutate al momento della diagnosi, abbiamo condotto uno studio retrospettivo. Sono state valutate pertanto differenti variabili cliniche e laboratoristiche, al momento della diagnosi, in cani successivamente sottoposti a terapia con trilostano (**Capitolo 6**).

Nell'uomo con SC di origine ipofisaria la chirurgia rappresenta la terapia d'elezione. L'intervento prevede un'adenomectomia selettiva dell'ipofisi. Nel cane si hanno poche informazioni riguardo a questo tipo di intervento ed è stata descritta l'ipofisectomia microchirurgica, che prevede l'ablazione totale dell'ipofisi e del relativo tumore secernente. In particolare, in corso di macroadenomi ipofisari questa tecnica risulta essere una delle pochissime opzioni terapeutiche. Il problema è che attualmente questo tipo di intervento viene routinariamente eseguito solo all'Università di Utrecht. Tale tipo di chirurgia presenta delle difficoltà tecniche intraoperatorie ed il post operatorio risulta essere particolarmente critico. A tale fine è iniziata una collaborazione fra l'Università di Utrecht e l'Università di Bologna per poter eseguire con successo questo intervento chirurgico. A tal proposito descriviamo un caso di SC conseguente ad un macroadenoma ipofisario che determinava già sintomatologia neurologica. Il soggetto, un cane Galgo

Spagnolo femmina di 8 anni, trattato inizialmente con terapia medica, è stato presentato presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie per la presenza di sintomi neurologici prosencefalici. La risonanza magnetica del cranio ha permesso la visualizzazione di un macroadenoma ipofisario di notevoli dimensioni. Il soggetto è stato sottoposto ad un primo intervento di ipofisectomia transfenoidale, che ha permesso di controllare la sintomatologia neurologica. Il ripresentarsi dei sintomi clinici e le immagini della risonanza magnetica di controllo, eseguita a due mesi dall'intervento, hanno evidenziato una recidiva della neoplasia ipofisaria. Pertanto il soggetto è stato sottoposto con successo ad un secondo intervento di ipofisectomia. Con il seguente caso clinico si descrive il primo intervento di ipofisectomia eseguito e documentato in Italia ed il follow-up terapeutico, come terapia del macroadenoma ipofisario associato a sintomatologia neurologica. (**Capitolo 7**).

Nel **Capitolo 8** sono riassunte le discussioni e conclusioni della presente tesi.

Capitolo 2

LA SINDROME DI CUSHING NEL CANE: EZIOPATOGENESI, SINTOMATOLOGIA E DIAGNOSI

S. Corradini, F. Fracassi

Veterinaria (2014) accettato e in corso di stampa

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Scuola di Agraria e Medicina
Veterinaria, Bologna.

RIASSUNTO

La sindrome di Cushing è una delle più frequenti endocrinopatie del cane. La diagnosi deve sempre prevedere l'integrazione dell'anamnesi, del segnalamento, dei segni clinici, degli esami di base, dei test endocrini specifici e della diagnostica per immagini. Effettuare un protocollo diagnostico completo in soggetti con sintomatologia caratteristica della patologia aumenta notevolmente la sensibilità e la specificità di ciascun test endocrino. Nella presente review si mettono a fuoco i principali aspetti eziopatogenetici, clinici, sintomatologici e diagnostici della Sindrome di Cushing nel cane.

ABSTRACT

The Cushing Syndrome is one of the most common canine endocrinopathies. The diagnosis requires the integration of anamnesis, signalment, clinical signs, blood work, specific endocrine tests and the diagnostic imaging. Performing a complete diagnostic work-up in patients with characteristic symptoms of the disease greatly increase the sensibility and specificity of the endocrine tests. In the present review we focus the main pathogenetic, clinical and diagnostic features of Cushing's syndrome in dogs.

INTRODUZIONE

Nel 1932, fu il neurochirurgo Harvey Cushing a descrivere per la prima volta nell'uomo, una sindrome clinica connessa alla presenza di un adenoma ipofisario basofilo ¹.

La Sindrome di Cushing (SC) o ipercortisolismo è una condizione piuttosto frequente nel cane ed è rappresentata dagli aspetti clinici e laboratoristici conseguenti ad uno stato ipercortisolemico cronico e patologico.

Il cortisolo è prodotto in eccesso a causa di una sovra-stimolazione delle surrenali ad opera di elevati livelli di ormone adrenocorticotropo (ACTH) oppure per cause non dipendenti dalle concentrazioni ematiche di ACTH. La forma ACTH-dipendente più frequente è quella ipofisaria "pituitary dependent hypercortisolism" (PDH) mentre quella surrenalica o "adrenal dependent hypercortisolism" (ADH) è la forma più comune non ACTH-dipendente. Questa revisione della letteratura ha lo scopo di mettere a fuoco gli aspetti eziopatogenetici clinici e diagnostici dell'ipercortisolismo spontaneo nel cane.

EPIDEMIOLOGIA

L'ipercortisolismo spontaneo è una patologia che colpisce solitamente soggetti di età compresa tra i 6 e i 20 anni² si può tuttavia osservare anche in animali di giovane età. Colpisce tutte le razze con una certa predilezione per i soggetti di piccola taglia quali il Barbone nano, il Bassotto e soggetti di taglia più grande quale ad esempio il Boxer³. Circa il 75% dei cani con PDH pesa meno di 20 kg, mentre più del 50% dei soggetti con ADH pesa più di 20 kg⁴.

Il ruolo di fattori genetici nello sviluppo della patologia non è stato tuttora chiarito, tuttavia è stata dimostrata una familiarità in soggetti di razza Dandie Dinmont terriers e Bassotto tedesco a pelo duro^{5,6}.

Nel cane l'incidenza di tale patologia è notevolmente più elevata rispetto all'uomo e al gatto^{7,8,9}.

EZIOPATOGENESI

Ipercortisolismo ACTH-dipendente

Ipercortisolismo secondario a tumore ipofisario

L'ipercortisolismo ipofisi-dipendente o pituitary dependent-hypercortisolism (PDH) rappresenta la forma più comune nel cane e si osserva circa nell'85% dei casi³. Le lesioni ipofisarie che causano un eccesso di ACTH partono da piccoli nidi di cellule corticotrope patologiche fino ad arrivare a tumori notevolmente estesi. Nella maggior parte dei casi si tratta di adenomi inferiori a 10 mm; in alcuni soggetti l'adenoma è così piccolo da non essere visualizzabile con la diagnostica per immagini avanzata; in tal caso si parla di microadenomi. Si tratta invece di macroadenomi quando raggiungono dimensioni superiori ai 10 mm; i carcinomi sono estremamente rari e sono definiti tali solo in presenza di metastasi extracraniche^{10,11,12}.

Gli adenomi possono originare dal lobo anteriore (AL, anterior lobe) o dalla pars intermedia (PI) dell'ipofisi. Circa nel 20-25% dei casi si tratta di un tumore della PI e ciò risulta di importante interesse clinico. Questi tumori tendono infatti ad avere maggiori dimensioni ma anche differente controllo ormonale¹³. La PI è infatti sotto il diretto controllo neuronale dopaminergico e non presenta recettori per i glicocorticoidi¹⁴. Venendo pertanto a mancare il feed-back negativo del cortisolo, tali neoplasie tendono a crescere maggiormente. Per lo stesso motivo gli adenomi della PI risultano quindi resistenti alla soppressione con desametasone¹⁰.

Produzione di ACTH ectopico

Nell'uomo questa forma si riscontra in seguito a tumori neuroendocrini maligni quali carcinomi polmonari, bronchiali, timici, pancreatici o tiroidei¹⁵. Nel cane tale forma è stata documentata solo in un Pastore Tedesco di 8 anni nel quale, il tessuto ipofisario, analizzato dopo ipofisectomia, non risultava essere adenomatoso. In questo caso l'ipersecrezione di ACTH era legata a una neoplasia pancreatica ACTH secernente¹⁶.

Ipercortisolismo ACTH indipendente

Ipercortisolismo secondario a tumore surrenalico

Circa il 15% dei cani affetti da ipercortisolismo presenta un tumore corticosurrenalico (adrenal tumor, AT) o adrenal dependent hypercortisolism (ADH). Dal punto di vista istologico queste neoplasie possono essere adenomi o carcinomi, nonostante tale distinzione non risulti sempre netta¹⁷. Nella maggior parte dei casi si tratta di neoplasie unilaterali che interessano con pari incidenza la surrenale destra o sinistra. Tumori bilaterali sono molto più rari e sono stati descritti nel 10% degli ADH^{18,19}. L'ADH si osserva solitamente in cani di età medio-adulta, più spesso di grossa taglia e non sembra esservi una predisposizione di sesso. Va segnalato che alcuni tumori surrenalici, in particolare i carcinomi, possono secernere ormoni sessuali²⁰. Nel cane è stata descritta anche la concomitante presenza di tumori corticosurrenalici secernenti cortisolo ed aldosterone^{21,22} o cortisolo e catecolamine²³. Infine, sono stati segnalati casi con simultanea presenza di ADH e PDH^{24,25}.

Ipercortisolismo iatrogeno

Questa condizione si verifica in seguito alla somministrazione prolungata o eccessiva di glucocorticoidi esogeni. Ciò che ne risulta sono i classici sintomi della SC, una soppressione dei livelli di ACTH plasmatici e conseguente atrofia surrenalica della zona fascicolata e reticolare. La sensibilità nei confronti dei glucocorticoidi esogeni è piuttosto individuale e non prevedibile.

Ipercortisolismo secondario alla presenza di recettori aberranti

Nell'uomo l'ipercortisolismo può essere secondario ad una forma di espressione ectopica o sovraespressione eutopica di recettori surrenalici²⁶. In medicina umana sono stati descritti differenti recettori corticosurrenalici correlati alla steroidogenesi, inclusi quelli per il GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide), le catecolamine, la vasopressina, la

serotonina ed i recettori per l'ormone luteinizzante²⁷. Recentemente è stato descritto un caso di un cane Vizsla di 6 anni con ipercortisolismo alimento-dipendente, nel quale l'espressione aberrante di recettori per il GIP era la causa dell'ipercortisolismo. In tale soggetto l'ipersecrezione di cortisolo non era legata alla stimolazione da parte dell'ACTH bensì da parte del GIP, un peptide gastrico che aumenta in seguito alla somministrazione del pasto ²⁸.

MANIFESTAZIONI CLINICHE

I segni clinici della SC sono causati dalla combinazione degli effetti glucogenici, immunosoppressivi, antinfiammatori, proteo-catabolici e lipolitici del cortisolo ²⁹.

E' importante ricordare l'estrema variabilità del quadro clinico associato allo stato di ipercortisolismo. Alcuni soggetti presentano numerosi sintomi estremamente evidenti mentre altri possono risultare estremamente paucisintomatici.

La maggior parte dei cani (80-90%) con Sindrome di Cushing viene portata in visita per l'insorgenza di **poliuria e polidipsia** (pu/pd)². Tali sintomi sono legati ad un'incapacità nel concentrare le urine; il cortisolo interferisce infatti con la secrezione e l'azione dell'ormone antidiuretico (ADH) con conseguente iso o ipostenuria²⁹. In corso di macroadenoma ipofisario la compressione meccanica della massa sull'ipotalamo e sulla neuroipofisi può ulteriormente compromettere la secrezione di ADH rendendo ancor più evidente il diabete insipido secondario a SC^{30,31}. Un altro sintomo estremamente comune, riportato in una percentuale che va dall'84 al 91% dei casi è la **polifagia**^{32,33,34}.

L'**aumento di volume** dell'addome, il cosiddetto "addome a botte"(Figura 1), caratteristico segno clinico nell'uomo, si osserva in una percentuale di cani che va dal 51 al 75%^{32,34} ed è secondario all'indebolimento della muscolatura addominale, ad un accumulo di grasso, ad epatomegalia e al fatto che la vescica risulti frequentemente repleta.



Figura 1: Bassotto Tedesco di 7 anni affetto da PDH, presenta tipico addome a botte, alopecia simmetrica bilaterale dell'addome e con placche di calcinosis cutis presente a livello addominale e lombare.

L'**atrofia muscolare** è causata dall'incremento del catabolismo proteico secondario all'eccesso di glucocorticoidi e verosimilmente anche dalla soppressa secrezione di ormone somatotropo (GH, growth hormone) che si osserva in questi animali³⁵.

Le alterazioni cutanee includono: mancata ricrescita del pelo dopo tricotomia, diradamento del mantello fino allo sviluppo della classica **alopecia simmetrica e bilaterale (Figure 1 e 2)** che solitamente interessa tronco e addome, risparmiando testa ed arti. L'ipercortisolismo causa infatti atrofia follicolare e pilosebacea determinando la caduta del pelo e la sua mancata ricrescita. La cute si può presentare **sottile, ipoelastica**, con evidenza della sottostante **trama vascolare** e tendenza a sviluppare ecchimosi ed ematomi. L'immunosoppressione indotta dall'ipercortisolismo aumenta inoltre la suscettibilità alle infezioni secondarie: batteriche, micotiche e parassitarie³. Meno comunemente si riscontrano comedoni ed iperpigmentazione³.



Figura 2: Cane Segugio italiano pelo forte , 11 anni, femmina affetta da ipercortisolismo ipofisi-dipendente; si noti l'alopecia simmetrica bilaterale e l'iperpigmentazione cutanea.

Un rilievo meno comune è la **calcinosis cutis (CC)(Figura 3)**, ovvero la deposizione distrofica di sali di calcio nel derma, epidermide o sottocute che si localizza a livello della regione temporale, linea mediana dorsale, collo e addome. L'esatto meccanismo patogenetico della CC non è ancora del tutto chiarito; si suppone che lo stato ipercortisolemico determini una maggior attività di gluconeogenesi e catabolismo proteico sulle fibrille di collagene con formazione di una matrice che tende ad attrarre e legare gli ioni calcio. Questa alterazione cutanea si può osservare anche in soggetti affetti da ipercortisolismo iatrogeno³⁶.



Figura 3 Cane Boxer 8 anni, maschio, affetto da ipercortisolismo ipofisi-dipendente, con grave calcinosis cutis lungo la linea mediana dorsale che coinvolge derma e sottocute dalla regione cervicale a quella toracica.

Dispnea e **tachipnea** che spesso si osservano nei soggetti con SC sono secondarie alla ridistribuzione del grasso a livello toracico e alla debolezza che coinvolge anche i muscoli respiratori. L'aumento di volume dell'addome esercita inoltre una pressione sul diaframma accentuando la difficoltà respiratoria. Altre cause di sintomi respiratori sono la presenza di mineralizzazioni dell'interstizio polmonare e tromboembolismo polmonare³. Sintomi meno frequenti sono l'atrofia testicolare nel maschio e l'anestro nella femmina³. Più raramente i cani affetti da SC sviluppano **miotonie** o **pseudmiotonie** caratterizzate da contrazioni e rigidità muscolare che conferiscono al soggetto un'andatura rigida soprattutto a carico degli arti posteriori (**Figura 4**). Nei cani affetti da macroadenoma la compressione delle strutture nervose circostanti può determinare la comparsa di **sintomi neurologici** quali circling, atassia, tetraparesi ed head pressing fino a crisi convulsive³. Nella **tabella 1** sono descritti i segni clinici più e meno comunemente associati alla SC.



Figura 4: Cane Barbone nano 10 anni, femmina, affetto da ipercortisolismo ipofisi-dipendente e pseudmiotonia. Entrambi gli arti posteriori si presentano estesi e rigidi. Nella foto è possibile notare il fatto che il cane non riesca a flettere gli arti neppure durante il decubito

Comuni	Meno comuni	Rari
Polidipsia	Letargia	Tromboembolismo
Poliuria	Iperpigmentazione cutanea	Lassità e rottura dei legamenti
Polifagia	Comedoni	Paralisi del nervo facciale
Polipnea	Cute sottile	Pesudomiotonia
Aumento di volume dell'addome	Scarsa ricrescita del mantello	
Alopecia simmetrica bilaterale	Atrofia testicolare	
Epatomegalia	Anestro persistente	
Debolezza muscolare		

Tabella 1: sono elencati i sintomi clinici più e meno comuni della Sindrome di Cushing nel cane, suddivisi sulla base della frequenza alla prima presentazione clinica (Behrend et al, 2013).

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Esame emocromocitometrico

In circa l'80% dei cani con SC si osserva linfopenia ed eosinopenia e nel 20-25% si assiste unicamente ad un incremento del numero totale dei leucociti³. Questi sono tutti elementi caratteristici del così detto leucogramma da stress.

Comunemente si riscontra anche un incremento del numero delle piastrine³.

Profilo biochimico

E' estremamente frequente riscontrare un aumento della fosfatasi alcalina (alkaline phosphatase, ALP), osservabile in circa nell'85-95% dei cani con SC. In questa specie l'ipercortisolismo determina infatti l'incremento dell'isoenzima indotto dai corticosteroidi SALP (steroid-induced ALP isoenzyme). Bisogna tuttavia ricordare che l'aumento dell'ALP è comune a molte condizioni patologiche o parafisiologiche e pertanto rappresenta un parametro estremamente poco specifico.

L'epatopatia indotta dai corticosteroidi ed una parziale induzione enzimatica determinano un incremento dell'ALT (alanina-aminotransferasi) che si accompagna spesso a valori di AST (aspartato-aminotransferasi) nella norma. Circa nel 70% dei casi si osserva inoltre un aumento della GGT (gamma glutamil transferasi). I glucocorticoidi stimolano la lipolisi determinando un incremento dei trigliceridi e colesterolo, condizione osservabile in più del 50% dei soggetti. In alcuni casi può essere presente una lieve iperglicemia a digiuno;

tale fenomeno è secondario all'insulino-resistenza cortisolo indotta e all'aumento della gluconeogenesi epatica. Nonostante ciò la SC sfocia in un vero e proprio diabete mellito solo nel 5-10% dei soggetti. L'aumento della diuresi può causare perdita urinaria di urea che può risultare pertanto bassa a livello sierico. Contrariamente a ciò che accade nell'uomo un'alterazione che si osserva circa nel 40% nei cani con Sindrome di Cushing è l'iperfosfatemia³⁷.

Esame delle urine

L'85% dei cani con SC presenta un peso specifico urinario inadeguato, nella maggior parte dei casi isostenurico, talvolta anche ipostenurico^{3,38}. Riscontro comune (>70% dei casi) è anche una marcata proteinuria con rapporto proteine-creatinina urinari (UPC) che oscilla tra 1.0-6.0³⁹. In circa il 40-50% dei soggetti si osservano infezioni del tratto urinario, presumibilmente correlate all'immunodepressione e alla presenza di intensa poliuria e polidipsia. Risulta pertanto opportuno inserire l'urinocoltura come parte integrante del workup diagnostico iniziale⁴⁰.

DIAGNOSI DI IPERCORTISOLISMO

La diagnosi di ipercortisolismo si basa sulla conferma di 2 caratteristiche: 1) *aumento della produzione di cortisolo* o 2) *diminuita sensibilità al feedback dei glucocorticoidi*. Nessun test ha il 100% di accuratezza diagnostica e pertanto risulta importante effettuare i test endocrini specifici solo in soggetti con sintomatologia clinica compatibile con la patologia. Partendo da una popolazione accuratamente selezionata la prevalenza della SC sarà pertanto maggiore e tutti i test diagnostici risulteranno più accurati⁴¹.

I test specifici per la diagnosi di ipercortisolismo si basano sulla dimostrazione della presenza di elevati livelli sierici/urinari di glucocorticoidi (valutazione del rapporto cortisolo-creatinina urinario UCCR), sulla dimostrazione di un'eccessiva risposta in seguito a stimolazione (test di stimolazione con ACTH), o testando la perdita del feed-back negativo a livello ipofisario da parte del cortisolo (test di soppressione a basse (LDDST) o alte dosi (HDDST) di desametasone nel sangue o nelle urine).

I test di screening utilizzati per capire se vi sia o meno la SC sono l'UCCR, il test di stimolazione con ACTH e il LDDST. Al fine di ottenere la conferma diagnostica in un soggetto con sospetto ipercortisolismo è opportuno avere la conferma da almeno due test endocrini specifici. I test e le altre metodiche diagnostiche di tipo differenziale (PDH vs ADH) sono rappresentati dall'LDDST, HDDST su urine, HDDST su sangue, dalla

misurazione dell'ACTH endogeno, dall'ecografia addominale e dalle tecniche di diagnostica per immagini avanzata quali la tomografia computerizzata e la risonanza magnetica nucleare.

Test di stimolazione con ACTH

E' il gold standard per la diagnosi di ipercortisolismo iatrogeno, tuttavia è uno dei test più comunemente effettuati per la diagnosi di ipercortisolismo spontaneo. Il suo utilizzo nella diagnosi della SC è dibattuto, opponendosi infatti ad uno dei principi dell'endocrinologia per cui in corso di patologia da iperfunzionalità è opportuno utilizzare test di soppressione, preferendo invece i test di stimolazione in corso di stati di ipofunzionalità ghiandolare.

Si basa sulla valutazione della cortisolemia prima ed un'ora dopo la somministrazione endovenosa o intramuscolare di ACTH sintetico (tetracosactide esacetato). In letteratura sono stati descritti numerosi protocolli che utilizzano differenti dosaggi dell'ACTH sintetico; è fondamentale che venga somministrata una dose sovra-fisiologica. Uno studio ha evidenziato che un dosaggio di 5µg/kg risulta adeguato per effettuare il test⁴². Da maggio 2013 il Synachten®, nome commerciale del tetracosactide esacetato, è stato tolto dal commercio in gran parte dell'Europa. Risulta tuttavia ancora disponibile come preparazione galenica.

Utilizzando le più comuni tecniche di determinazione ormonale (es. chemiluminescenza) un cane sano presenta valori basali di cortisolo ematico compresi tra 0.5 e 6.0 µg/dl. Tipicamente i valori post-stimolazione sono compresi tra 6 e 17 µg/dl. Valori post-stimolazione che vanno da 17 a 22 µg/dl sono considerati dubbi e non diagnostici, invece, valori post-stimolazione superiori a 22 µg/dl rendono positivo il test e sono suggestivi di ipercortisolismo. Soggetti affetti da ipercortisolismo iatrogeno mostrano valori basali di cortisolo ematico bassi o normali, tuttavia tali concentrazioni non subiscono variazioni in seguito alla somministrazione di ACTH esogeno.

La sensibilità del test varia notevolmente nei vari studi e va dal 57% al 95% risultando comunque più bassa nelle forme surrenaliche; la specificità dipende molto dalla popolazione di soggetti testati e varia dal 59-93%^{4,21,43,44,45,46}. E' stato osservato infatti come i falsi positivi aumentino in corso di malattie concomitanti quali malattie renali croniche, diabete mellito, malnutrizione e vari altri stati patologici; soggetti con patologie concomitanti mostrano pertanto una specificità al test medio-bassa⁴⁷. Questo test è comunemente utilizzato per il monitoraggio terapeutico dei soggetti con SC sottoposti a terapia con trilostano o mitotane. La determinazione del cortisolo è comunemente eseguita su campioni di siero o plasma EDTA tramite metodiche validate nel cane; la metodica più utilizzata nei laboratori italiani è quella a chemiluminescenza e meno

comunemente il RIA (radioimmunoassay). Alcuni laboratori stanno inoltre iniziando ad utilizzare in modo routinario anche la spettrometria di massa. Il cortisolo sierico è un ormone stabile, tuttavia, nel caso in cui il campione venga spedito ad un laboratorio esterno, è bene che viaggi refrigerato. Per la valutazione della cortisolemia non è strettamente necessario il digiuno dell'animale prima del prelievo, tuttavia è opportuno non utilizzare sieri evidentemente lipemici.

LDDS test

Il rationale di questo test è rappresentato dal fatto che in cani senza SC la somministrazione di desametasone sopprime la produzione di cortisolo endogeno; nei soggetti con SC, invece, la soppressione risulta assente o soltanto parziale¹⁰. Prevede la valutazione del cortisolo sierico prima (T0) e dopo 4 (T4) e 8 (T8) ore dalla somministrazione endovenosa di 0,01 mg/kg di desametasone. La cortisolemia a T8 permette di confermare la diagnosi di ipercortisolismo: il test viene considerato negativo se la cortisolemia a T8 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, sono suggestivi di SC. La cortisolemia rilevata dopo 4 ore può risultare utile nel differenziare una forma ipofisaria da una surrenalica. Nei cani con ADH la somministrazione di desametasone non ha alcun effetto sui livelli già bassi di ACTH e pertanto non si osservano rilevanti decrementi della cortisolemia a T4. In cani affetti da PDH, la somministrazione di desametasone può determinare quadri differenti per quanto riguarda la cortisolemia a 4 ore. Nel 20% dei soggetti, al pari di ciò che accade nelle forme surrenaliche, non si verifica alcuna soppressione del cortisolo ematico; in un altro 20% si ha una lieve soppressione; nel 30-40% dei casi di PDH il T4 risulta inferiore del 50% rispetto al cortisolo basale ma non inferiore a 1,4 µg/dl, nel restante 25% dei PDH il cortisolo ematico a 4 ore scende a livelli inferiori a 1,4 µg/dl. Nei casi di assente o minima soppressione della cortisolemia a T4 risulterà impossibile (valutando solo questo test) distinguere PDH da ADH. Ne consegue che solo nel 60% dei cani affetti da PDH si ottiene una risposta chiara sulla localizzazione già al test di soppressione³. Nei soggetti affetti da ADH, invece, non si ha alcuna soppressione della produzione di cortisolo da parte delle surrenali. Uno dei vantaggi di questo test è rappresentato dall'alta sensibilità che si aggira tra l'85 e il 100%^{4,43,48,49,50}. La specificità, come per il test di stimolazione, varia in relazione alla popolazione selezionata, andando dal 44% in cani con malattie concomitanti⁴³ fino al 73% in soggetti attentamente selezionati in base ai segni clinici e laboratoristi indicativi di ipercortisolismo³.

Rapporto cortisolo:creatinina urinari

Questo test si basa sul principio che l'escrezione urinaria di creatinina è piuttosto costante nelle 24 ore e pertanto il rapporto tra cortisolo e creatinina elimina l'interferenza del volume urinario. Questo rapporto riflette quindi il valore della cortisolemia all'incirca delle 8 ore precedenti la raccolta delle urine⁵¹. Per confermare l'ipercortisolemia sarebbe opportuno analizzare due campioni di urina prelevati al mattino in due giorni consecutivi. La raccolta delle urine deve essere eseguita a casa dal proprietario per caduta, e non prima di due giorni dopo la visita in clinica, onde evitare ogni fonte di stress per l'animale. La sensibilità di questo test varia dal 75% al 100%^{43,52,53,54}. La differenza tra questi valori è dovuta principalmente alle diverse metodiche utilizzate per misurare il cortisolo e la creatinina urinari, dalla tecnica di prelievo delle urine e dall'ora nella quale è effettuato il prelievo. La specificità di questo test differisce molto a seconda degli studi e sono stati riportati valori dal 20-25%^{43,53,52} fino al 77% nel caso in cui l'esame si effettui su una popolazione adeguatamente selezionata (segni clinici e laboratoristici compatibili di SC)⁴⁸. E' considerato un buon test di screening per l'alta sensibilità, il poco tempo richiesto e la facilità nell'esecuzione. Vista l'elevata sensibilità, a fronte di una bassa specificità, risulta maggiormente utile come test di esclusione della patologia.

HDDS test e HDDS test su urine

L'utilizzo dell'HDDST risulta utile nei casi in cui l'LDDST non sia stato in grado di differenziare ADH da PDH. Infatti, una neoplasia ipofisaria che non ha risposto (assenza di soppressione della cortisolemia) a basse dosi di desametasone potrebbe rispondere a dosi maggiori; mentre, in corso di ADH non si verifica alcuna soppressione del cortisolo ematico indipendentemente dalla dose di desametasone utilizzata.

Questo test si effettua misurando la cortisolemia prima e 3-4 ore dopo la somministrazione endovenosa di 0,1 mg/kg di desametasone. Non bisogna dimenticare che, anche con questo test, circa il 15-25% dei casi di PDH non presenta alcuna soppressione, comportandosi pertanto come un ADH; ciò si verifica soprattutto per le neoplasie che originano dalla pars intermedia dell'ipofisi. La sensibilità dell' HDDST nel localizzare il problema a livello ipofisario risulta essere di circa il 75% ed è lievemente maggiore rispetto alla sensibilità dell'LDDST (65%)⁵⁵.

L'HDDST può inoltre essere effettuato valutando il rapporto cortisolo creatinina urinari⁵⁶. Il protocollo prevede la raccolta delle urine per due giorni consecutivi, poi, dopo aver raccolto quelle del secondo giorno, il proprietario verrà istruito affinché somministri PO al proprio cane 0,1 mg/kg di desametasone ogni 8 ore. La mattina del terzo giorno viene collezionato un ulteriore campione di urine. Nei tre campioni viene valutato il rapporto

cortisolo/creatina urinario. Il risultato dei primi due campioni serve per capire se vi sia o meno la patologia. Nel caso in cui il risultato dell'UCCR del terzo campione risulti inferiore al 50% della media dei valori dei due campioni prelevati i due giorni precedenti, l'animale ha un PDH oppure non è affetto da ipercortisolismo; in quest'ultimo caso le elevate concentrazioni di cortisolo urinario potrebbero essere legate a stress o ad altre patologie. Nel caso in cui, invece, il terzo valore non risulti soppresso per più del 50% della media dei primi due valori si è di fronte ad un'ipercortisolemia non sopprimibile e vi è il 50% di possibilità che si tratti di un PDH e un 50% di probabilità che sia un ADH⁵⁶.

ACTH endogeno

La misurazione dell'ACTH plasmatico è il test più accurato per differenziare in caso di AT. In caso di PDH e di secrezione ectopica di ACTH i livelli della corticotropina endogena risultano essere superiori a quelli fisiologici. Questo si verifica nell'85-90% dei casi delle neoplasie ipofisarie, con un 10-15% di soggetti che mostrano dei livelli che rimangono tuttavia nei ranges di normalità⁵⁷. Nel caso invece di neoplasie surrenaliche o di ipercortisolismo iatrogeno le quantità di ACTH nel sangue risultano inferiori ai 10 pg/ml e frequentemente al di sotto del limite inferiore di capacità di rilevazione del test⁵⁷. Particolari accorgimenti devono essere adottati per il campione ematico, essendo l'ACTH facilmente degradato dalle proteasi plasmatiche se il campione non è adeguatamente processato. Il campione dovrà pertanto essere collezionato in provette con EDTA siliconate e preventivamente raffreddate, mantenute in ghiaccio dopo il prelievo fino alla processazione. Se il campione viene inviato ad un laboratorio esterno è necessario accertarsi che sia utilizzata una metodica validata per il cane, e che il campione arrivi congelato. In alternativa può essere aggiunto uno specifico preservante (aprotinina).

Nuove prospettive diagnostiche

Al pari di ciò che accade in medicina umana, anche in veterinaria recenti studi hanno valutato la possibilità di utilizzare nuove metodiche, idealmente meno invasive per la diagnosi di SC nel cane. Come parametro potenzialmente utile è stato testato il cortisolo salivare. Le concentrazioni di cortisolo nella saliva di cani con SC risultano maggiori rispetto ai cani sani, tuttavia il maggior limite per l'utilizzo di tale metodica riguarda il campionamento del substrato che non risulta di semplice esecuzione⁵⁸. Studi recenti hanno invece valutato il pelo come possibile matrice su cui testare i livelli di cortisolo, mettendo in evidenza come le concentrazioni di cortisolo nei cani con SC siano più elevate rispetto a soggetti sani e malati^{59,60}.

Sebbene questi metodi risultino poco invasivi, attualmente sono utilizzati solo in ambito di ricerca e ulteriori studi sono necessari per chiarire l'effettivo valore diagnostico e l'applicabilità clinica di tali determinazioni.

DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

La diagnostica per immagini rappresenta senza dubbio un utile mezzo per supportare la diagnosi di SC e soprattutto per discriminare le forme ipofisarie da quelle surrenaliche. Come per i test endocrini specifici, anche la diagnostica per immagini deve essere effettuata in soggetti nei quali si sospetti la patologia. In tal caso la sensibilità e la specificità dei rilievi ottenuti risultano di gran lunga più elevate.

Ecografia Addominale

Attraverso l'ecografia addominale è possibile valutare direttamente forma e volume delle surrenali, allo stesso tempo è possibile stabilire la presenza di altre alterazioni conseguenti o meno all'ipercortisolismo. Epatomegalia con segni di epatopatia, vescica repleta e calcolosi vescicale sono i reperti più comuni³. In particolare, il diametro del polo caudale surrenalico è il criterio comunemente utilizzato per valutare l'aumento di volume della ghiandola, ed è considerato normale fino a 7,4 mm⁶¹. Recenti studi hanno tuttavia valutato la possibilità di giudicare le dimensioni surrenaliche anche sulla base della taglia dell'animale⁶². L'ecografia, essenziale in corso di AT, può valutarne le dimensioni, l'invasione vascolare e dei tessuti locali. Moderata asimmetria, atrofia della ghiandola controlaterale con normale ecostruttura o la combinazione di una o più caratteristiche è indicativa di AT. In corso di AT la surrenale contro laterale risulta solitamente avere un diametro del polo caudale <5 mm⁶³. Inoltre, ecograficamente non è possibile distinguere tra un'iperplasia macronodulare da un AT. Sebbene la maggior parte dei AT siano unilaterali esistono anche forme bilaterali. In corso di AT caratteri di malignità includono metastasi toraciche e/o addominali e masse surrenaliche con un diametro >4 cm^{41,64}. Non bisogna dimenticare che in corso di PDH è possibile riconoscere surrenali normali o aumentate di volume talvolta accompagnate da moderata asimmetria⁶⁵.

Tomografia Computerizzata (TC) e Risonanza Magnetica Nucleare(RMN)

In tutti i soggetti con diagnosi di PDH sarebbe opportuno valutare direttamente l'ipofisi mediante tecniche di diagnostica per immagini avanzata; oltre a dare un importante ausilio diagnostico, tali metodiche forniscono utili informazioni in merito alla possibile opzione terapeutica e alla prognosi. Il primo segno di un aumento di volume ipofisario è

solitamente l'incremento di volume in altezza. Le lesioni ipofisarie in corso di PDH vanno da poche cellule iperplastiche (microtumori) fino a grandi tumori (macrotumori) (Figura 5)⁶⁶. La somministrazione di mezzo di contrasto in un cane con ipofisi di dimensioni normali permette inizialmente l'identificazione dell'ipofisi posteriore con il caratteristico "pituitary flush". L'assenza di tale caratteristica indica invece un'atrofia dell'ipofisi posteriore secondaria a compressione di un tumore ipofisario. Una distorsione od uno spostamento del "pituitary flush" può essere usato per localizzare microtumori ipofisari localizzati anteriormente⁶⁷. Le dimensioni dell'ipofisi sono piuttosto variabili tra le razze, tuttavia il rapporto tra l'altezza dell'ipofisi e l'area cerebrale ovvero il P:B ratio (rapporto P:B) permette di discriminare tra ipofisi ingrandita ($P:B > 0,31$) e normale ($P:B \leq 0,31$)¹⁰. Mediante TC vengono messe in evidenza il 50-60% delle neoplasie ipofisarie, mentre nel rimanente 40-50% per le dimensioni impercettibili non è rilevata alcun neoformazione². Nei soggetti con sintomatologia clinica compatibile alla presenza di macrotumori diventa essenziale eseguire una TC o MRI per pianificare interventi terapeutici quali l'ipofisectomia o la radioterapia. In particolare la CT permette miglior visualizzazione dei punti di repere ossei essenziali nel caso in cui si scelga l'ipofisectomia transfenoidale^{68,69}. Al contrario la MRI permette miglior evidenza dei tessuti molli ed ha miglior sensibilità per l'individuazione di microadenomi⁶⁶.

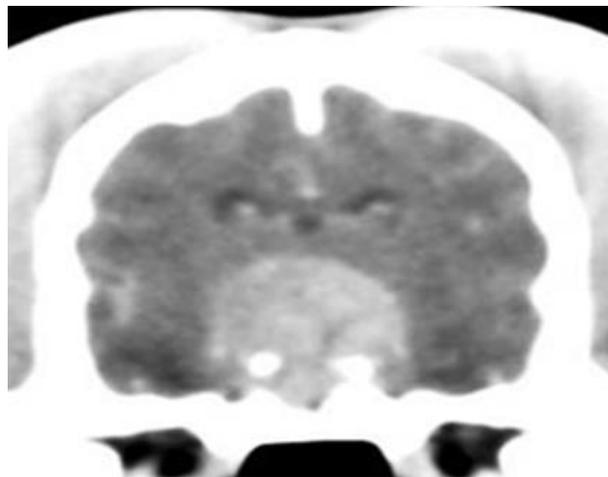


Figura 5: tomografia computerizzata del cranio in un cane meticcio maschio di 8 anni affetto da ipercortisolismo ipofisi dipendente. Nell'immagine post contrasto, ottenuta a livello di diencefalo, è evidente una massa occupante spazio nella regione ipotalamico-ipofisaria

BIBLIOGRAFIA

1. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). *Bull Johns Hopkins Hospital* 50: 137-195, 1932.
2. Melian C, Pèrez-Alenza MD, Peterson ME. Hyperadrenocorticism in dogs. In Ettinger SJ, Feldman EC (eds): *Textbook of Veterinary Internal Medicine, Disease of Dog and Cat*, ed 7. Elsevier, 2010, pp.1816-1840.
3. Feldman EC, Nelson RW: Canine hyperadrenocorticism. In *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, ed 3: St.Louis, WB Saunders, 2004 pp. 252-319.
4. Reusch CE, Feldman EC. Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5:3-10, 1991.
5. Stritzel S, Mischke R, Philipp U *et al.* Familial canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism in wirehaired Dachshunds. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 121:349-58, 2008.
6. Scholten-Sloof BE, Knol BW, Rijnberk A *et al.* Pituitary-dependent hyperadrenocorticism in a family of Dandie Dinmont terriers. *The Journal of Endocrinology* 135:535-42, 1992.
7. Willeberg P and Priester WA. Epidemiological aspects of clinical hyperadrenocorticism in dogs (canine Cushing's syndrome). *Journal of American Animal Hospital Association* 18:717-724, 1982.
8. Hatipoglu BA. Cushing's Syndrome. *Journal of Surgical Oncology* 106:565-571, 2012.
9. Fracassi F, Mandrioli L, Diana A *et al.*: Pituitary macroadenoma in a cat with diabetes mellitus, hypercortisolism and neurological signs. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* 54:359-363, 2007.
10. Kooistra HS, Voorhout G, Mol JA *et al.* Correlation between impairment of glucocorticoid feedback and the size of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The Journal of Endocrinology* 152:387-94,1997.
11. Hanson J.M., van't Hoofd M.M., Voorhout G *et al.* Efficacy of transsphenoidal hypophysectomy in treatment of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19:687-694, 2005.
12. -Hanson JM, Teske E, Voorhout G *et al.* Prognostic factors for outcome after transsphenoidal hypophysectomy in dogs with pituitary-depenent hyperadrenocortism. *Journal of Neurosurgery* 107:830-840, 2007.

13. Peterson ME, Krieger DT, Drucker WD *et al.* Immunocytochemical study of the hypophysis of 25 dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Acta Endocrinologica* 101:15-24, 1982.
14. Antakly T, Sasaki A., Liotta AS *et al.* Induced expression of the glucocorticoid receptor in the rat intermediate pituitary lobe. *Science* 229:277-279, 1985.
15. Terzolo M, Reimondo G, Ali A *et al.* Ectopic ACTH syndrome: molecular bases and clinical heterogeneity. *Annals of Oncology* 12:S83-87, 2001
16. Galac S, Kooistra HS, Voorhout G *et al.* Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domestic Animal Endocrinology* 28:338-348, 2005.
17. Bernard MH, Sidhu S, Berger N *et al.* A case report in favour of multistep adrenocortical tumorigenesis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14:151-156, 2003.
18. Ford SL, Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism caused by bilateral adrenocortical neoplasia in dogs: Four cases (1983-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 202:789-792, 1993.
19. Hoerauf A, Reusch CE. Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 35:193-199, 1999.
20. Hill KE, Scott-Moncrief JC, Koshko MA *et al.* Secretion of sex hormones in dogs with adrenal dysfunction. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226:556-56, 2005.
21. Behrend EN, Kempainen RJ, Boozer AL *et al.* Serum 17-alpha-hydroxyprogesterone and corticosterone concentrations in dogs with nonadrenal neoplasia and dogs with suspected hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 11:1762-1767, 2005.
22. Machida T, Uchida E, Matsuda K *et al.* Aldosterone-, corticosterone and cortisol-secreting adrenocortical carcinoma in a dog: case report. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 70:317-320, 2008.
23. Von Dehn BJ, Nelson RW, Feldman EC *et al.* Pheochromocytoma and hyperadrenocorticism in dogs: six cases(1982-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207:322-324, 1995.
24. Greco DS, Peterson ME, Davidson AP *et al.* Concurrent pituitary and adrenal tumors in dogs with hyperadrenocorticism: 17 cases (1978-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214:642-647, 1999.

25. Thuròczy J, van Sluijs FJ, Kooistra HS *et al.* Multiple endocrine neoplasia in a dog: corticotrophic tumor, bilateral adrenocortical tumors, and pheochromocytoma. *Veterinary Quarterly* 20:56-61, 1998.
26. Lacroix A, Bourdeau I, Lampron A. Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clinical Endocrinology* 73:1-15, 2010.
27. Lacroix A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Best Practice Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 23: 245-259, 2009.
28. Galac S, Kars VJ, Voorhout G *et al.* ACTH independent hyperadrenocorticism due to food dependent hypercortisolemia in a dog: a case report. *The Veterinary Journal* 177:141-143, 2008.
29. Galac S, Reusch CE, Kooistra HS *et al.* Adrenals. In Rijnberk A, Kooistra HS. *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats. An illustrated text.* Hannover: Schlutersche 2010, pp.93-154.
30. Ferguson DC e Biery DN. Diabetes insipidus and hyperadrenocorticism associated with high plasma adrenocorticotropin concentration and a hypopthalamic/pituitary mass in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193: 835-839, 1988.
31. Harb MF, Nelson RW, Feldman EC *et al.* Central diabetes insipidus in dogs:20 cases (1986-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209:1884-1888, 1996.
32. Feldman EC. Evaluation of twice-daily lower-dose trilostane treatment administered orally in dogs with naturally occurring hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238:1441-1451, 2011.
33. Ruckstuhl NS, Nett C, Reusch C. 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.
34. Alenza DP, Arenas C, Lopez ML *et al.* Long-term efficacy of trilostane administered twice daily in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Journal of the American Animal Hospital Association* 42:269-276, 2006.
35. Meij BP, Mol JA, Bevers MM *et al.* Alterations in anterior pituitary function of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Endocrinology* 154:505-512, 1997.
36. Doerr KA, Outerbridge CA, White SD *et al.* Calcinosis cutis in dogs: histopatological and clinical analysis of 46 cases. *Veterinary Dermatology* 24:355-379, 2013.

37. Ramsey IK, Tebb A, Harris EJ *et al.* Hyperparathyroidism in dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of Small Animal Practice* 46:531-536, 2005.
38. Peterson ME. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 22:2-11, 2007.
39. Mazzi A, Fracassi F, Dondi F *et al.* Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Veterinary Research Communications* 32:299-301, 2008.
40. Forrester SD, Troy GC, Dalton MN *et al.* Retrospective evaluation of urinary tract infection in 42 with hyperadrenocorticism or diabetes mellitus or both. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13:557-560, 1999.
41. Behrend EN, Kooistra HS, Nelson R *et al.* Diagnosis of Spontaneous Canine Hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement (Small Animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:1292-1304, 2013.
42. Behrend EN, Kemppainen RJ, Bruyette DS *et al.* Intramuscular administration of a low dose of ACTH for ACTH stimulation testing in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229:528-530, 2006.
43. Kaplan AJ, Peterson ME, Kemppainen RJ. Effects of disease on the results of diagnostic tests for use in detecting of hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207:445-451, 1995.
44. 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.
45. van Liew CH, Greco DS, Salman MD. Comparison of results of adrenocorticotrophic hormone stimulation and low-dose dexamethasone suppression test with necropsy findings in dogs: 81 cases (1985-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211:322-325, 1997.
46. Monroe WE, Panciera DL, Zimmerman KL. Concentrations of non cortisol adrenal steroids in response to ACTH in dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism, pituitary dependent hyperadrenocorticism, and nonadrenal illness. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26:945-952, 2012.
47. Kaplan AJ, Peterson ME. Effects of non adrenal disease on adrenal function tests in dogs. In: Bonagura JD (ed): *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2000.
48. Rijnberk A, Van Wees A, Mol JA. Assessment of two tests for the diagnosis of canine hyperadrenocorticism in dogs. *The Veterinary Record* 122:178-180, 1988.

49. Chastain CB, Franklin RT, Ganjam VK, Madsen RW. Evaluation of the hypothalamic pituitary-adrenal axis in clinically stressed dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 22:435–442, 1986.
50. Feldman EC, Feldman MS, Nelson RW. Use of low and high-dose dexamethasone tests for distinguishing pituitary-dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209:772–775, 1996.
51. Van Vonderen IK, Kooistra HS, Rijnberk A. Influence of veterinary care on the urinary corticoid:creatinine ratio in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12:431-435, 1998.
52. Smiley LE, Peterson ME. Evaluation of a urine cortisol:creatinine ratio as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7:163–168, 1993.
53. Feldman EC, Mack RE. Urine cortisol:creatinine ratio as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200:1637–1641, 1992.
54. Jensen AL, Iverson L, Koch J, et al. Evaluation of the urinary cortisol:creatinine ratio in the diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 38:99–102, 1997.
55. Gilor C., Graves TK. Interpretation of laboratory tests for canine Cushing's syndrome. *Topics in Companion Animal Medicine* 26:98-108, 2011.
56. Galac S, Kooistra HS, Teske E *et al.* Urinary corticoid/creatinine ratios in the differentiation between pituitary dependent hyperadrenocorticism and hyperadrenocorticism due to adrenocortical tumor in the dog. *Veterinary Quarterly* 19:17–20, 1997.
57. Rodriguez Pineiro MI, Bechenkroun G., De Fornel-Thibaud P *et al.* Accuracy of an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) immunoluminometric assay for differentiating ACTH- dependent from ACTH-independent hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:850-855, 2009.
58. Wenger-Riggenbach B, Boretti FS, Quante S *et al.* Salivary cortisol concentrations in healthy dogs and dogs with hypercortisolism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24:551-556, 2010.
59. Corradini S, Accorsi PA, Boari A *et al.* Evaluation of hair cortisol in the diagnosis of hypercortisolism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:1268-1272, 2013.

60. Ouschan C, Kuchar A, Möstl E et al.: Measurement of cortisol in dog hair: a noninvasive tool for the diagnosis of hypercortisolism. *Veterinary Dermatology* 24:428-431, 2013.
61. Barthez PY, Nyland TG, Feldman EC. Ultrasonography of the adrenal glands in the dog, cat, and ferret. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 28:869-85, 1998.
62. Mogicato G, Layssol-Lamour C, Conchou F *et al.* Ultrasonographic evaluation of the adrenal glands in healthy dogs: repeatability, reproducibility, observer-dependent variability, and the effect of bodyweight, age and sex. *The Veterinary Record* 168:130, 2011.
63. Benckekroun G, de Fornel-Thibaud P, Rodríguez *et al.* Ultrasonography criteria for differentiating ACTH dependency from ACTH independency in 47 dogs with hyperadrenocorticism and equivocal adrenal asymmetry. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24:1077-1085, 2010.
64. Besso JG, Penninck DG, Gliatto JM. Retrospective ultrasonographic evaluation of adrenal lesions in 26 dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 38:448-455, 1997.
65. Grooters AM, Biller DS, Theisen SK et al. Ultrasonographic characteristics of the adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: comparison with normal dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10:110-115,1996.
66. Auriemma E, Barthez PY, Van der Vlugt-Meijer RH *et al.* Computed tomography and low resonance imaging of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism:11 cases (2001-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 235:409-414, 2009.
67. Van der Vlugt-MeijerRH, Meij BP, van den Ingh TSGAM *et al.* Dynamic computed tomography of the pituitary gland in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17:773-780, 2003.
68. Meij B, Voorhout G, Rijnberk A. Progress in transsphenoidal hypophysectomy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs and cats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197:89-96, 2002.
69. Pisoni L, Del Magno, Lotti D *et al.* Ipofisectomia transfenoidale in un cane con ipercortisolismo e sintomi neurologici secondari a macroadenoma ipofisario. *Veterinaria* 26:25-35, 2012.

Capitolo 3

TERAPIA MEDICA DELLA SINDROME DI CUSHING NEL CANE

S. Corradini, E. Malerba, F. Fracassi

29

Veterinaria, inviato alla rivista, in fase di revisione

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Scuola di Agraria e Medicina
Veterinaria, Bologna

RIASSUNTO

Nel corso degli anni diversi principi attivi sono stati testati per il trattamento della Sindrome di Cushing nel cane. Il mitotane, un farmaco adrenolitico molto efficace ma poco "maneggevole", è stato il farmaco maggiormente utilizzato nel passato. Da più di un decennio è disponibile il trilostano, un inibitore enzimatico che si è dimostrato efficace nel controllo della disendocrinia ed è ufficialmente approvato per il trattamento dell'ipercortisolismo canino. Nella presente review viene discusso l'approccio terapeutico medico alla Sindrome di Cushing nel cane con particolare riferimento alla valutazione di differenti principi attivi.

ABSTRACT

Over the years several drugs were tested for the treatment of canine Cushing's syndrome. Mitotane is an adrenolytic drug that is very effective but not very "wieldy", it was the drug most widely used in the past. For more than a decade is available trilostane, an enzyme inhibitor that has proven effective in the control of this endocrinopathy and it is officially approved for the treatment of canine hypercortisolism. In this review it is discussed the therapeutic approach to medical Cushing's syndrome in the dog with particular attention at the evaluation of different drugs.

INTRODUZIONE

L'obiettivo della terapia della Sindrome di Cushing (SC) è di contrastare lo stato ipercortisolemico permettendo quindi di eliminare e controllare i segni clinici. Le opzioni terapeutiche in corso di SC sono sia di tipo chirurgico che medico; è pertanto necessario in primo luogo definire se l'ipercortisolismo risulti secondario ad un tumore ipofisario piuttosto che surrenalico, valutare la presenza di eventuali patologie concomitanti o metastasi ed infine considerare la compliance del proprietario.

Per quanto riguarda la terapia medica, nel corso degli anni sono stati proposti dei principi attivi con diversi meccanismi d'azione, con la finalità di ridurre la secrezione di cortisolo e di conseguenza risolvere i sintomi clinici ad esso connessi. In questa revisione della letteratura verranno descritti gli approcci terapeutici attraverso l'utilizzo di principi attivi maggiormente utilizzati e verrà fatto cenno a terapie meno studiate o di minore efficacia.

TRATTAMENTO DELLE FORME IPOFISARIE

Il trattamento del “*pituitary dependent hypercortisolism*” (PDH) dovrebbe essere diretto all’eliminazione dello stimolo alla produzione di cortisolo, ovvero dovrebbe intervenire sulla lesione ipofisaria responsabile dell’eccessiva produzione di ACTH (ormone adrenocorticotropo). A questo proposito l’ipofisectomia transfenoidale, seguita da una terapia ormonale sostitutiva, è considerata la terapia d’elezione nell’uomo¹. Tale intervento viene eseguito tuttavia in pochi centri specializzati, nei quali il paziente deve essere gestito in stretta collaborazione tra chirurgo ed endocrinologo, e necessita di una terapia intensiva all’avanguardia^{2,3}. In alternativa, nei soggetti nei quali tale opzione terapeutica non può essere presa in considerazione, la terapia medica prevede l’utilizzo di diversi principi attivi quali il mitotane⁴, il trilostano^{5,6} o il ketoconazolo⁷.

MITOTANE

Il mitotane (*o,p’-DDD*) è un farmaco derivato dal DDT (*Dicloro-Difenil-Tricloroetano*), con azione adrenocorticolitica, per anni il principio attivo di scelta per il PDH. Il suo effetto è mirato ad una necrosi selettiva e progressiva della zona fasciolata e reticolare della corteccia surrenalica, ossia i siti di produzione dei glucocorticoidi. La zona glomerulosa (ZG), deputata alla produzione di mineralcorticoidi, risulta meno sensibile alla sua azione ma viene interessata se vengono utilizzati dosaggi elevati. Per il mitotane sono disponibili due tipi di protocolli terapeutici. Il primo, definito **protocollo standard o selettivo**, mira alla distruzione della zona fasciolata (ZF) e della zona reticolare (ZR), risparmiando invece la ZG e quindi la produzione dei mineralcorticoidi⁴. Il secondo, o **protocollo non selettivo**, determina invece la necrosi dell’intera corteccia surrenalica causando un ipoadrenocorticismo o morbo di Addison iatrogeno, che necessita dell’integrazione ormonale⁸. Con la lisi completa della corticale surrenalica si assiste infatti ad un minor numero di recidive; tuttavia, il proprietario deve essere a conoscenza che l’ipoadrenocorticismo indotto può risultare pericoloso per la vita dell’animale se non viene eseguita un’adeguata terapia sostitutiva con glucocorticoidi e mineralcorticoidi. L’utilizzo del mitotane è sconsigliato nel caso in cui in casa dell’animale siano presenti donne in gravidanza o bambini piccoli⁹.

La differenza tra i due approcci terapeutici si basa sulla dose di farmaco e la durata del cosiddetto periodo di induzione o carico. Il *protocollo selettivo* prevede una fase di induzione ed una fase di mantenimento. Durante la *fase di induzione* il mitotane viene somministrato ad un dosaggio di 30-50 mg/kg al giorno suddiviso in due dosi da somministrare assieme al pasto, il quale ne migliora l’assorbimento. La durata di questa

fase è indicativamente di una decina di giorni ovvero finché non si assiste ad una riduzione dell'appetito e della sete o alla comparsa di altri sintomi riferibili all'ipoadrenocorticismo⁴. Un test di stimolazione con ACTH, effettuato allo scadere dei 10 giorni o alla comparsa dei sintomi sopracitati, consente di valutare l'efficacia del periodo di induzione. Valori di cortisolo basale compresi tra 1 e 4 µg/dl con ridotto o assente incremento della cortisolemia dopo stimolazione con ACTH (<4 µg/dl) sono indicativi di un'adeguata induzione. Valori post stimolazione <1 µg/dl suggeriscono una completa distruzione della corteccia surrenalica. In questi casi è opportuno sospendere il trattamento e supplementare l'animale con glucocorticoidi per qualche giorno. In circa il 10-15% dei cani si osservano valori di cortisolemia post stimolazione maggiori di 4 µg/dl. In questi casi la fase di induzione con mitotane deve proseguire monitorando strettamente il soggetto. Ottenuti valori di cortisolo post stimolazione compresi tra 1 e 4 µg/dl^{4,10} o tra 1 e 5 µg/dl¹¹ si continua con la *fase di mantenimento* ad un dosaggio di 50 mg/kg/settimana suddiviso in due o tre somministrazioni. Si consiglia di monitorare il cane con un test di stimolazione con ACTH dopo un mese dall'inizio del periodo di mantenimento, poi ogni 3-6 mesi. Circa il 50% dei soggetti sottoposti a tale protocollo presenta recidive nei primi 12 mesi di trattamento, con cortisolo post stimolazione maggiore di 4 µg/dl e sintomi di ipercortisolismo. In tali casi è possibile ripetere la fase di induzione e nella fase di mantenimento utilizzare una dose aumentata del 50% rispetto alla precedente. In alternativa, per evitare una nuova fase di induzione, può essere indicato semplicemente alzare del 50% la dose di mantenimento. Nonostante il protocollo selettivo, il 5% dei cani trattati sviluppa un ipoadrenocorticismo iatrogeno permanente⁴. Questi soggetti mostrano una scarsa o assente risposta alla stimolazione con ACTH ed alterazioni elettrolitiche quali iperkaliemia ed iponatremia. In questi casi la terapia con glucocorticoidi e mineralcorticoidi viene integrata per il resto della vita del soggetto¹⁰. Nei cani affetti da PDH trattati con mitotane viene riportata una sopravvivenza media che va da 1,7 anni⁴ a 1,9 anni¹².

Il *protocollo non selettivo* prevede la distruzione completa della corteccia surrenalica^{13,8}. In questo protocollo il farmaco deve essere somministrato per 25 giorni continuativi alla dose di 50-75 mg/kg (100 mg/kg nei cani di piccola taglia), suddivisa in tre o quattro dosi giornaliere, sempre con l'alimento. La somministrazione deve essere quotidiana per i primi 5 giorni e poi a giorni alterni. Il terzo giorno ha inizio la terapia sostitutiva con cortisone acetato (2 mg/kg/die) (eventualmente prednisolone) e fludrocortisone acetato (0,0125 mg/kg/die), entrambi preferibilmente divisi in due somministrazioni giornaliere. Dopo 25 giorni di trattamento va eseguita una visita di controllo e la dose di cortisone acetato/prednisolone può essere ridotta a 0,5-1,0 mg/kg al giorno. Il proprietario deve

essere adeguatamente istruito affinché somministri la terapia sostitutiva con cortisone acetato/prednisolone, infatti nel caso in cui l'animale non riesca ad assumere l'integrazione *per os* è necessario che questa venga somministrata per via parenterale. Nonostante la drastica azione adrenocorticolitica, è possibile che ricompaiano i sintomi della patologia a distanza di mesi o anni dall'applicazione del protocollo; in questi casi va ripetuto il trattamento con mitotane.

Gli effetti indesiderati quali nausea, vomito e diarrea possono verificarsi poco dopo l'inizio della somministrazione per le alterazioni che il farmaco stesso può causare a carico del tratto gastro-intestinale. Vomito, diarrea, debolezza, atassia, possono inoltre essere secondari alla carenza di glucocorticoidi, e non è pertanto sempre facile distinguere le due condizioni¹⁴.



Figura 2: Cane, meticcio, maschio di 11 anni affetto da PDH, a sinistra (A) presenta addome a botte e alopecia simmetrica bilaterale, a destra (B) dopo 3 mesi di terapia presenta completa ricrescita del pelo e riduzione del volume dell'addome.

TRILOSTANO

Il trilostano è uno steroide sintetico, privo di attività glucorticoide e mineralcorticoide, che agisce come adrenocorticostatico inibendo in modo competitivo l'enzima *3-β-idrossisteroide-deidrogenasi/isomerasi (3β-HSD)*. Questo sistema enzimatico media la conversione del *pregnenolone* a *progesterone* e del *17-idrossipregnenolone* a *17-idrossiprogesterone* nella corticale surrenalica¹⁵. Il cortisolo, l'aldosterone e l'androstenedione sono prodotti a partire dal progesterone e dal 17-idrossipregnenolone. Il trilostano, inibendo la produzione di questi due precursori, determina la riduzione della sintesi dei vari steroidi prodotti dalle surrenali, dalle gonadi e dalla placenta (**Fig.1**). Ne consegue la mancata produzione di progesterone e dei prodotti finali quali il cortisolo e, in minor misura, l'aldosterone^{15,16}. Oltre all'effetto sulla *3β-HSD*, il trilostano inibisce inoltre

altri enzimi, quali la 11 β -idrossilasi e la 11 β -idrossisteroidodeidrogenasi (11 β -HSD), influenzando così la conversione del cortisolo in cortisone⁶.

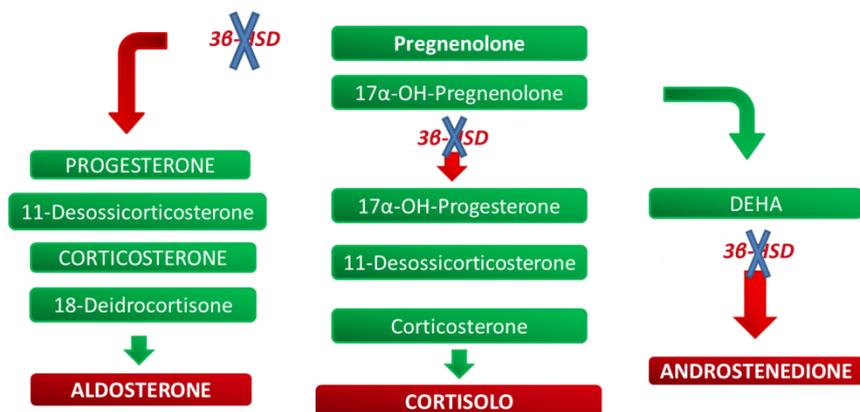


Figura 1 :Illustrazione schematica della cascata enzimatica che nella corteccia surrenalica porta alla formazione di mineralcorticoidi, glucocorticoidi e androgeni. Il trilostano blocca l'azione della 3 β -HSD che converte il pregnenolone in progesterone e il deidroepiandrostenedione (DHEA) in androstenedione.

Il trilostano determina la perdita/diminuzione del feedback negativo del cortisolo sulla secrezione di ACTH e pertanto i cani trattati con questo farmaco presentano livelli ematici di ACTH particolarmente elevati^{5,6}. Nei soggetti sottoposti a questa terapia si osserva inoltre una lieve riduzione delle concentrazioni di aldosterone plasmatico tuttavia con valori che solitamente rimangono all'interno dei ranges di riferimento^{15,17}. In medicina umana l'utilizzo di tale principio attivo ha portato a risultati incostanti e pertanto non viene considerato un'opzione terapeutica in corso di SC^{18,19,20,21}.

La prima segnalazione sull'utilizzo del trilostano in corso di ipercortisolismo canino risale al 1998²²; già allora era stato descritto come un farmaco capace di garantire una buona risposta terapeutica con risoluzione della sintomatologia clinica ed assenza di effetti collaterali. Da allora, numerosi studi ne hanno confermato l'efficacia clinica nel trattamento della SC, determinando così un incremento del suo utilizzo soprattutto in cani affetti da PDH^{15,17,23,24,25,26}.

Il trilostano viene rapidamente assorbito attraverso il tratto gastroenterico. La somministrazione assieme al pasto migliora il grado e la velocità dell'assorbimento.

Attualmente il trilostano (Vetoryl®) è disponibile in capsule da 10, 30 e 60 mg ed è l'unico farmaco registrato in Italia per il trattamento della SC. In passato venivano suggeriti dosaggi estremamente elevati. In particolare, venivano riportati al termine del periodo di studio dosaggi che oscillavano dai 5 ai 50 mg/kg q24h^{17,23,24,28}. I vari studi hanno permesso di rivalutare notevolmente il dosaggio e attualmente le indicazioni prevedono un dosaggio di partenza nettamente più basso, con valori riportati di 1-2,5 mg/kg q12h¹⁰ o 2 mg/kg q24h²⁹. In cani sani il farmaco raggiunge il suo picco ematico a 1,5-2 ore dall'assunzione e torna a livelli basali dopo circa 10-18 ore²⁸. Nei cani con ipercortisolismo

invece, la durata della soppressione del cortisolo risulta piuttosto variabile e non prevedibile. In molti cani la cortisolemia rimane controllata per intervalli di tempo inferiori alle 13 ore, per cui la somministrazione ogni 24h può risultare inadeguata^{28,30,31,32}. Pertanto, nei soggetti che presentano uno scarso controllo della sintomatologia clinica è opportuno considerare l'ipotesi di una più breve durata dell'azione del trilostano, pertanto, in tali soggetti è può risultare utile la somministrazione q12h o addirittura ogni q8h^{23,24,28,33,34}. Nei diversi studi che hanno valutato la somministrazione q12h i dosaggi ottimali per il controllo dei sintomi connessi all'ipercortisolismo sono risultati compresi tra 0,86 mg/kg³⁴ e 1,8 mg/kg ad ogni somministrazione³⁵.

PROTOCOLLO DI UTILIZZO DEL TRILOSTANO	
1.	<p>Il farmaco deve essere somministrato ad orario fisso, al mattino, con l'alimento, ad una dose di partenza compresa tra i 1-2 mg/kg q24h o 0,9-2 mg/kg q12h. Nei cani di piccola taglia (<10 kg) iniziare con la dose più bassa possibile. Il primo test di stimolazione con ACTH va eseguito dopo 7-14 giorni dall'inizio della terapia, 2-3h dopo la capsula del mattino.</p> <p>In tale occasione, oltre alle valutazioni anamnestiche, sono eseguiti esami emato-chimici ed urinari.</p> <p>a) Se i segni clinici sono regrediti e la cortisolemia post-ACTH è compresa tra 1,5 e 5,4 µg/dl (40-150 nmol/l), la terapia è definita adeguata e mantenuta fino ai successivi controlli.</p> <p>b) Se i segni clinici sono regrediti, ma la cortisolemia è < 1,5µg/dl in entrambi i campioni, si suggerisce di interrompere per 5-7 giorni la terapia e di riprenderla con una posologia inferiore. Nella maggior parte dei casi questi pazienti non manifestano segni di ipoadrenocorticismismo poiché la cortisolemia tende ad aumentare rapidamente.</p> <p>c) Se la cortisolemia post-ACTH è > a 5,4 µg/dl e il cane non presenta miglioramenti clinici la posologia viene aumentata. Non sono disponibili ad oggi indicazioni precise riguardo all'incremento della posologia per i cani che rientrano in questa categoria, tuttavia può essere seguito il seguente schema proposto da Galac et al. (2010): da 10 a 20mg, da 20 a 30mg, da 30 a 40mg, da 40 a 60mg, da 60 a 90mg, da 90 a 120 mg ecc.</p> <p>d) Se il paziente presenta una cortisolemia tra 1,5 e 5,4 µg/dl ma non manifesta miglioramenti clinici, in funzione della severità dei sintomi, valutare se aumentare la dose, passare alla somministrazione q12h o rivalutare dopo 4 settimane con la stessa dose.</p> <p>e) Se i segni clinici sono regrediti ma la cortisolemia post-ACTH è compresa tra 5,4 e 9,0 µg/dl (150-250 nmol/l), continuare con la stessa dose e ricontrrollare dopo 4 settimane.</p> <p>f) Nei soggetti sottoposti a somministrazione ogni 12 h nel caso in cui i sintomi clinici non risultino sotto controllo e la cortisolemia post-ACTH sia ≤5,5µg/dl aumentare la frequenza di somministrazione ogni 8 ore (Feldman, 2011).</p> <p>g) Se il cane è in evidente stato patologico: interrompere la terapia (per 2-5 giorni), identificare la causa della malattia (eseguire test di stimolazione con ACTH ed esami emato-chimico-urinari), trattare in modo sintomatico.</p>
2.	<p>Valutare segni fisici, ematologici e biochimici e ripetere il test di stimolazione con ACTH dopo 4 e 12 settimane dall'inizio della terapia, poi ogni 3 mesi e dopo 10 giorni da ogni variazione nella posologia. Le procedure elencate al punto 1 sono applicabili anche nel monitoraggio a medio-lungo termine.</p>

Tabella 1 : Protocollo di utilizzo e monitoraggio della terapia con trilostano in soggetti affetti da SC. Modificato dal Consensus Meeting svoltosi ad Amsterdam nel 2006.

L'utilizzo di basse dosi di trilostano riduce la possibilità di eventuali reazioni da sovradosaggio quali anoressia, letargia, vomito e diarrea, tipici della carenza di glucocorticoidi e mineralcorticoidi. Nei casi con sintomatologia sia lieve, è sufficiente interrompere il trattamento per 2-5 giorni, al termine dei quali è opportuno rivalutare il cane clinicamente e mediante test di stimolazione con ACTH. Casi più gravi richiedono invece l'ospedalizzazione, la valutazione degli elettroliti, la somministrazione di fluidi ed eventuale una terapia sostitutiva con glucocorticoidi e mineralcorticoidi. Data la

reversibilità dell'azione del trilostano, la funzionalità surrenalica dovrebbe tornare ai livelli precedenti nell'arco di pochi giorni, tuttavia sono descritti casi di ipoadrenocorticismo trilostano-indotto di lunga durata^{23,24,36}. Non è ancora del tutto chiaro se i casi di ipoadrenocorticismo persistente possano essere riconducibili ad un effetto diretto del farmaco o piuttosto ad un eccesso di ACTH che può determinare necrosi surrenalica^{36,38}. In alcuni cani il trilostano risulta più efficace nel bloccare la sintesi di mineralcorticoidi rispetto a quella di glucocorticoidi; in tali soggetti si osservano sintomi clinici gravi quali vomito diarrea, disidratazione, iponatremia ed iperkaliemia in presenza di valori di cortisolo pre e post ACTH non particolarmente bassi³⁴.

La notevole variabilità nella risposta di ciascun soggetto, unita al fatto che nella maggior parte dei casi sono necessari degli adeguamenti di dosaggio (a loro volta subordinati alle formulazioni disponibili in commercio di capsule da 10, 30 e 60 mg), richiede l'obbligo di un attento monitoraggio. Questo deve includere la raccolta anamnestica, l'esame fisico e test di stimolazione con ACTH. Risulta importante monitorare anche le concentrazioni plasmatiche di sodio, potassio, creatinina, urea ed enzimi epatici²⁹.

Solitamente dopo circa 1 settimana di terapia alla dose appropriata si assiste ad una riduzione della quantità di acqua assunta e di urina prodotta nonché ad una maggiore vitalità del soggetto; sono invece necessari tempi maggiori per assistere ad un miglioramento dei sintomi dermatologici e della ricrescita del mantello.

Il protocollo per l'utilizzo di tale molecola è stato definito in un Consensus Meeting tenutosi ad Amsterdam nel 2006 ed è riportato schematicamente nella **Tabella 1**, aggiornato secondo le indicazioni degli studi più recenti. L'efficacia della terapia con trilostano è giudicata sulla base della risoluzione della sintomatologia clinica secondaria all'ipercortisolismo e sulla risposta ottenuta al test di stimolazione con ACTH. Lo scopo di questo test è di testare la capacità di riserva surrenalica nel momento di massima azione, ovvero a 2-3 ore dalla somministrazione del farmaco. Per tale motivo il giorno del controllo dovrà essere ricordato al proprietario di somministrare la capsula come in qualsiasi altro giorno.

Il rapporto cortisolo:creatinina urinari (*UC:CR*) è stato indagato come possibile sostituto al test di stimolazione nel monitoraggio della terapia con trilostano^{24,40}. Il cortisolo urinario è risultato essere poco affidabile nel monitoraggio terapeutico, tuttavia l'*UC:CR* può risultare utile nell'identificare precocemente i soggetti sottoposti ad un eccessivo dosaggio di trilostano⁴⁰.

Recentemente è stato valutato il possibile utilizzo del cortisolo basale come possibile parametro nel monitoraggio della terapia con trilostano. Nonostante si siano rilevate

discrete correlazioni tra i valori di cortisolo basale e quelli post stimolazione, si è visto che il solo cortisolo basale non può sostituirsi al test di stimolazione con ACTH^{41,42,38}.

Nei cani con PDH sottoposti a terapia con trilostano sono state descritte modificazioni ipofisarie secondarie alla perdita del feedback negativo del cortisolo sull'ACTH; in particolare è stato osservato un aumento delle dimensioni dell'ipofisi⁴³. Tale condizione è ben riconosciuta nell'uomo e definita come "Sindrome di Nelson", ovvero la crescita dell'adenoma in seguito ad adrenalectomia bilaterale con conseguente riduzione del feedback negativo esercitato dal cortisolo sull'ipofisi.

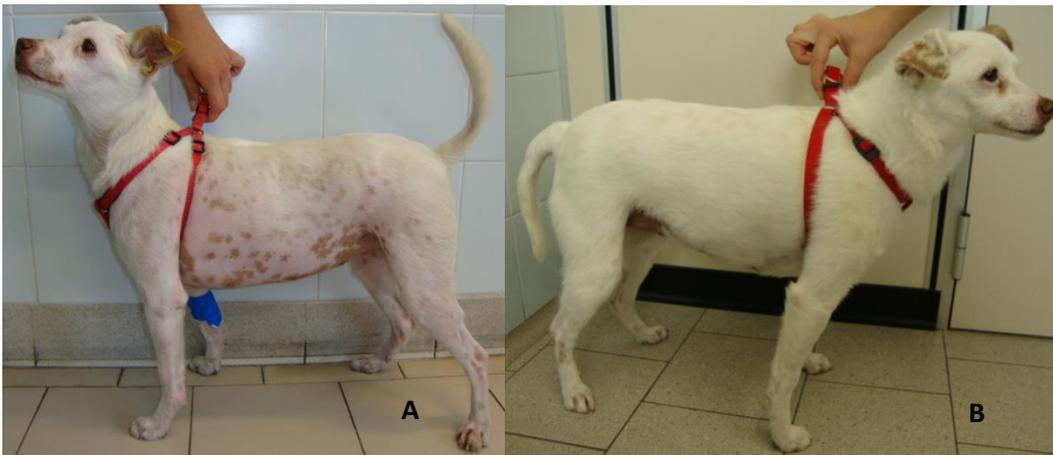


Figura 3: Cane, meticcio femmina di 9 anni affetto da PDH a sinistra presenta aumento di volume dell'addome con alopecia simmetrica bilaterale a destra (B) dopo 4 mesi di terapia presenta pelo folto e assenza di addome "a botte".

Mitotane versus trilostano nella terapia del PDH

Alcuni studi hanno messo a confronto l'utilizzo di mitotane e trilostano^{12,14,44,45}. Entrambi i farmaci permettono un miglioramento della sintomatologia clinica; in particolare con entrambi i farmaci si assiste rapidamente ad una riduzione della poliuria/polidipsia, più tardivi sono invece la risoluzione delle alterazioni dermatologiche e la ricrescita del pelo. Nei cani trattati con mitotane si osserva una diminuzione ecografica delle dimensioni surrenaliche⁴⁶, invece, durante la terapia con trilostano, si osserva un aumento di volume delle ghiandole; in questo caso si suppone ciò sia legato all'accumulo di precursori del cortisolo^{17,47}. I tempi mediani di sopravvivenza in cani con PDH trattati con trilostano vanno da 662⁴⁴ a 900 giorni³⁶ mentre, se trattati con mitotane vanno da 708⁴⁴ a 720 giorni¹².

Gli studi che hanno comparato i tempi di sopravvivenza fra trattamento con mitotane o trilostano non hanno tuttavia evidenziato delle differenze statisticamente significative^{12,44,45}. L'unico fattore che sembra significativamente influenzare il tempo di

sopravvivenza è l'età all'inizio del trattamento; si è infatti visto che cani con età più avanzata alla diagnosi tendono a vivere meno¹².

ALTRI PRINCIPI ATTIVI

Il **ketoconazolo** è un derivato imidazolico propriamente utilizzato come antimicotico. Ad elevati dosaggi è in grado di bloccare la sintesi degli ormoni steroidei mediante un'interferenza con gli enzimi citocromo P450⁷. La sua azione determina una riduzione dei livelli di cortisolo, mentre l'effetto sui mineralcorticoidi risulta minimo. Il dosaggio consigliato è di 5 mg/kg q12h per una settimana; al termine di tale periodo, nel caso in cui il farmaco risulti ben tollerato, si passa alla somministrazione di 10 mg/kg q12h⁷. In alcuni cani sono necessari 15 mg/kg q12h per controllare l'ipercortisolismo; a tali dosaggi tuttavia risultano comuni degli effetti collaterali quali vomito, anoressia, ittero e diarrea. Tali problematiche possono essere controllate somministrando il farmaco con l'alimento e riducendo temporaneamente il dosaggio. Un adeguato controllo va valutato mediante test di stimolazione con ACTH al fine di ottenere valori di cortisolo all'interno del range di riferimento. Il costo elevato, la somministrazione due volte al giorno e soprattutto la mancanza di efficacia in più di un terzo degli animali trattati ne hanno limitato l'utilizzo nella terapia dell'ipercortisolismo del cane⁴⁸.

La **selegilina** è un inibitore selettivo ed irreversibile della MAO-B (MonoAmminoOssidasi di tipo B), un enzima implicato nel ripristino delle concentrazioni di dopamina e facilita la trasmissione dopaminergica in diversi processi. L'utilizzo di tale farmaco deriva dal fatto che circa il 30% delle neoplasie ipofisarie colpisce la pars intermedia, la quale è sotto il diretto controllo inibitorio dopaminergico. Il suo uso è piuttosto controverso in parte per i metaboliti attivi, derivati delle anfetamine ed inoltre per la mancata efficacia clinica riscontrata nel cane^{39,49,50}.

Altre molecole testate in corso di PDH nel cane includono la **cabergolina**, un inibitore della somatostatina⁵¹, e l'**acido retinoico**⁵²; tuttavia il loro utilizzo è limitato a scopi di ricerca e la loro efficacia è ancora non del tutto chiara.

L'**aminoglutemide**, un altro inibitore della steroidogenesi è stato testato in cani con PDH, tuttavia la scarsa efficacia e gli effetti collaterali ne limitano l'utilizzo⁵³.

TRATTAMENTO DELLE FORME SURRENALICHE

In corso di ADH (*adrenal dependent hypercortisolism*) la terapia d'elezione è sicuramente l'adrenalectomia che può essere eseguita per via laparoscopica o laparotomica^{54,55,56}. Prima dell'intervento chirurgico è indispensabile valutare se il soggetto sia un buon candidato per la chirurgia. In particolare, il trattamento di tipo chirurgico è sconsigliato nel caso in cui la diagnostica per immagini abbia evidenziato una massa neoplastica inoperabile (es. per eccessiva invasione delle strutture adiacenti) o la presenza di metastasi a carico di altri organi, nonché in caso di eccessiva debilitazione dell'animale o di mancata compliance del proprietario. In tali soggetti è opportuno procedere con la terapia medica. In passato questi soggetti venivano sottoposti preferibilmente a terapia con mitotane, tuttavia, un recente studio su cani con ADH ha evidenziato che i soggetti trattati con mitotane avevano una mediana di sopravvivenza di 102 giorni mentre quelli trattati con trilostano di 353 giorni; da un punto di vista statistico i tempi di sopravvivenza non sono risultati essere significativamente differenti⁴⁵. In tale studio il tempo di sopravvivenza era negativamente influenzato solo dalla presenza di metastasi alla diagnosi⁴⁵. In uno studio è stato osservato che i dosaggi di trilostano necessari per il controllo dei segni clinici nei cani con ADH sono più bassi rispetto a quelli con PDH³⁴. La terapia medica può inoltre essere utilizzata per stabilizzare le condizioni cliniche del paziente nel periodo pre-operatorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Barker FG, Klibanski A, Swearingen B. Transsphenoidal surgery for pituitary tumors in the United States, 1996-2000: mortality, morbidity, and the effects of hospital and surgeon volume. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88:4709-4719, 2003.
2. Meij B, Voorhout G, Rijnberk A. Progress in transsphenoidal hypophysectomy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs and cats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197:89-96, 2002.
3. Pisoni L, Del Magno, Lotti D *et al.* Ipofisectomia transfenoidale in un cane con ipercortisolismo e sintomi neurologici secondari a macroadenoma ipofisario. *Veterinaria* 26:25-35, 2012.
4. Kintzer PP, Peterson ME. Mitotane (o,p'-DDD) treatment of 200 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5:182-185, 1991.
5. Witt AL, Neiger R. Adrenocorticotrophic hormone levels in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism following trilostane therapy *The Veterinary Record*,154:399-400, 2004.
6. Sieber-Ruckstuhul NS, Boretti FS, Wenger M *et al.* Cortisol, aldosterone, cortisol precursor, androgen, endogenous ACTH concentrations in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Domestic Animal Endocrinology* 31:63-75, 2006.
7. Lien YH, Huang HP Use of ketoconazole to treat dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 48 cases (1994-2007). *Journal of American Veterinary Medical Association* 233:1896-901, 2008.
8. Den Hertog E, Braakman JCA, Teske E *et al.* Results of non-selective adrenocorticolysis by o,p-DDD in 129 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The Veterinary Record* 144:12-17, 1999.
9. Galac S, Reusch CE, Kooistra HS *et al.*: Adrenals. In Rijnberk A, Kooistra HS. *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats. An illustrated text.* Hannover: Schlutersche, 2010, pp.93-154.
10. Melian C, Pèrez-Alenza MD, Peterson ME: Hyperadrenocorticism in dogs. In Ettinger SJ, Feldman EC (eds): *Textbook of Veterinary Internal Medicine, Disease of Dog and Cat*, ed 7. Elsevier, 2010,pp.1816-1840.
11. Angles JM, Feldman EC, Nelson RW *et al.* Use of urine cortisol:creatinine ratio versus adrenocorticotrophic hormone stimulation testing for monitoring mitotano

- treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211:1002-1004, 1997.
12. Clemente M, De Andrè PJ, Arenas C *et al.* Comparison of non selective adrenocorticolysis with mitotane or trilostane for the treatment of dogs with pituitary-dependent hyperdrenocorticism. *The Veterinary Record* 16: 805-809, 2007.
 13. Rijnberk A, Belshaw BE. An alternative protocol for the medical management of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism *The Veterinary Record* 122: 486-488, 1988.
 14. Reine NJ. Medical Management of pituitary-dependent hyperadrenocorticism: mitotane versus trilostane. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 22:18-25, 2007.
 15. Wenger M, Sieber-Ruckstuhl NS, Müller C *et al.* Effect of trilostane on serum concentrations of aldosterone, cortisol, and potassium in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *American Journal of Veterinary Research* 65:1245-50, 2004.
 16. Potts GO, Creange JE, Hardong HR *et al.* Trilostane, an orally active inhibitor of steroids biosynthesis. *Steroids* 32:257-267, 1978.
 17. 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.
 18. Dewis P, Anderson DC, Bullock DE *et al.* Experience with trilostane in the treatment of Cushing syndrome. *Clinical Endocrinology* 18:533-540, 1983.
 19. Semple CG, Beastall GH, Gray CE *et al.* Trilostane in the management of Cushing's syndrome. *Acta Endocrinologica* 102:107-110, 1983.
 20. Winterberg B, Vetter W, Groth H *et al.* Primary aldosteronism: treatment with trilostane. *Cardiology* 72:117-121, 1985.
 21. Williams CJ, Barley V, Blackledge G, *et al.* Multicenter study of trilostane: a new hormonal agent in advanced postmenopausal breast cancer. *Cancer Treatment Reports* 71:1197-1201, 1987.
 22. Hurley K, Sturgess K, Cauvin A *et al.* The use of trilostane for treatment of hyperadrenocorticism in dogs, (ACVIM Abstract) *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12:210, 1998.

23. Neiger R, Ramsey I, O'Connor J *et al.* Trilostane treatment of 78 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The Veterinary Record* 150:799-804, 2002.
24. Braddock JA, Church DB, Robertson ID *et al.* Trilostane treatment in dogs with pituitary -dependent hyperadrenocorticism. *Australian Veterinary Journal* 81:600-607, 2003.
25. Fracassi F, Mazzi A, Pietra M *et al.* Terapia con trilostano in 23 cani affetti da iperadrenocorticismo. *Veterinaria* 21:9-16, 2007.
26. Augusto M, Burden A, Neiger R *et al.* A comparison of once and twice daily administration of trilostane to dogs with hypeadrenocorticism. *Tierärztliche Praxis* 40:415-424, 2012.
27. Cho KD, Kang JH, Chang D *et al.* Efficacy of low-and high-dose trilostane treatment in dogs(<5 kg) with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:91-98, 2013.
28. Bell R, Neiger R, McGrotty Y *et al.* Study of the effects of once daily doses of trilostane on cortisol coconcentrations and responsiveness to adrenocorticotrophic hormone in hyperadrenocorticoid dogs. *The Veterinary Record* 159:277-281, 2006.
29. Galac S, Buijtel JJ, Mol JA *et al.* Effects of trilostane on the pituitary-adrenocortical and renin-aldosterone axis in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. *The Veterinary Journal* 183:75-80, 2010.
30. Vaughan MA, Feldman EC, Hoar BR *et al.* Evaluation of twice daily, low-dose trilostane treatment administered orally in dogs with naturally occurring hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 232:1321-1328, 2008.
31. Neiger R, Hurley K. 24-hour cortisol values in dogs with hyperadrenocorticism on trilostane (Abstract). *Journal of Small Animal Practice* 42:376, 2001.
32. Griebisch C, Lehnert C, Williams GJ *et al.* Effect of trilostane on hormone and serum electrolyte concentrations in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:160-165, 2014.
33. Feldman EC, Kass PH. Trilostane dose versus body weight in the treatment of naturally occurring pituitary- dependent hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26:1078-1080, 2012.
34. Feldman EC. Evaluation of twice-daily lower-dose trilostane treatment administered orally in dogs with naturally occurring hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238:1441-1451, 2011.

35. Arenas C, Melian C, Perez-Alenza MD. Evaluation of 2 trilostane protocols for the treatment of canine pituitary –dependent hyperadrenocorticism: twice daily versus once daily. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:1478-1485, 2013.
36. Perez-Alenza MD, Arenas C, Lopez ML *et al*, Long-term efficacy of trilostane administered twice daily in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of the American Animal hospital Association* 42:269-276, 2006.
37. Reusch CE, Sieber.Ruckstuhl N, Wenger M *et al*. Histological evaluation of the adrenal glands of seven dogs with hyperadrenocorticism treated with trilostane. *The Veterinary Record* 160:219-224, 2007.
38. Burkhardt WA, Boretti FS, Reusch CE *et al*. Evaluation of baseline cortisol, endogenous ACTH, and cortisol/ACTH ratio to monitor trilostane treatment in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:919-923,2013.
39. Braddock JA, Church DB, Robertson ID *et al*. Inefficacy of selegiline in treatment of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Australian Veterinary Journal* 82:272-277, 2004.
40. Galac S, Buijtel JJ, Kooistra HS. Urinary corticoid:creatinine ratios in dogs with pituitary- dependent hypercortisolism during trilostane treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:1214-1219, 2009.
41. Cook AK, Bond KG. Evaluation of the use of baseline cortisol concentration as a monitoring tool for dogs receiving trilostane as a treatment for hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 237:801-805, 2010.
42. Corradini S, Bresciani F, Pietra M *et al*. Valutazione del cortisolo basale per il monitoraggio della terapia con trilostano in cani affetti da ipercortisolismo spontaneo (Abstract).72°Congresso Internazionale SCIVAC Milano, 2012.
43. Teshima T., Hara Y., Takekoshi S., Nezu Y., Harada Y., Yogo T., Teramoto A., Osamura RY., Tagawa M. Trilostane-induced inhibition of cortisol secretion results in reduced negative feedback at the hypothalamic-pituitary axis. *Domestic Animal Endocrinology*;36(1):32-44, (2009)
44. Barker En, Campbell S, Tebb AJ *et al*. A comparison of survival times of dogs treated with mitotane or trilostane for pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19:810-815, 2005.
45. Helm JR, McLauchlan G, Boden LA *et al*. A comparison of factors that influence survival in dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism treated with mitotane or trilostane. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25:251-260, 2011.

46. Hoerauf A, Reusch C. Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 35:193-199, 1999.
47. Mantis P, Lamb CR, Witt AL *et al.* Changes in ultrasonographic appearance of adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 44:682-85, 2003.
48. Behrend EN, Kemppainen RJ, Clark TP, Salman MD *et al.* Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs: a survey of internists and dermatologists. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 220:1643-1649, 2002.
49. Bruyette DS, Ruehl WW, Entriken T *et al.* Management of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism with l-deprenyl (Anipryl). *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 27:273-286, 1997.
50. Reusch CE, Steffen T., Hoerauf A. The efficacy of L-Deprenyl in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13:291-301, 1999.
51. Castillo VA, Gómez NV, Lalia JC *et al.* Cushing's disease in dogs: cabergoline treatment. *Research in Veterinary Science* 85:26-34, 2008.
52. Castillo VA, Giacomini D, Páez-Pereda M *et al.* Retinoic acid as a novel medical therapy for Cushing's disease in dogs. *Endocrinology* 147:4438-4444, 2006.
53. Pérez AM, Guerrero B, Melián C *et al.* Use of aminoglutethimide in the treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in the dog. *Journal of Small Animal Practice*. 43:104-108, 2002.
54. van Sluijs FJ, Sjollem BE, Voorhout G *et al.* Results of adrenalectomy in 36 dogs with hyperadrenocorticism caused by adreno-cortical tumour. *Veterinary Quarterly* 17:113-116, 1995.
55. Schwartz P, Kovak JR, Koprowski A *et al.* Evaluation of prognostic factors in the surgical treatment of adrenal gland tumors in dogs: 41 cases (1999-2005). *Journal of American Veterinary Medical Association*. 232:77-84, 2008.
56. Jiménez Peláez M, Bouvy BM, Dupré GP. Laparoscopic adrenalectomy for treatment of unilateral adrenocortical carcinomas: technique, complications, and results in seven dogs. *Veterinary Surgery* 37:444-453, 2008.

Capitolo 4

VALUTAZIONE DEL CORTISOLO NEL PELO NELLA DIAGNOSI DI IPERCORTISOLISMO NEL CANE

INTRODUZIONE

La diagnosi di SC, come precedentemente descritto, deve sempre includere l'integrazione della sintomatologia clinica, esami di laboratorio, diagnostica per immagini e test endocrini specifici. Sia in medicina umana che in veterinaria si è costantemente alla ricerca di test diagnostici accurati e poco invasivi. Nell'uomo attualmente la diagnosi di SC viene eseguita mediante la valutazione dei livelli di cortisolo nell'urina e nella saliva. In medicina veterinaria l'utilizzo del cortisolo salivare nel cane sembra riflettere le effettive concentrazioni sieriche, tuttavia il limite maggiore riguardo all'utilizzo di tale metodica è relativo alla raccolta del campione, pertanto poco utilizzabile nella pratica clinica.

Negli ultimi anni in medicina umana sono diversi gli studi che hanno utilizzato il capello come matrice per la valutazione di diverse molecole tra cui gli steroidi. Questo campione biologico risulta piuttosto interessante in quanto il cortisolo sierico viene incorporato nel capello/pelo durante la sua crescita. L'utilizzo di questa matrice offre diversi vantaggi. Il cortisolo incorporato nel pelo non risente delle fluttuazioni giornaliere come ad esempio lo stress del prelievo ematico; inoltre rispecchia l'andamento del cortisolo in un arco temporale maggiore. Inoltre il prelievo di questa matrice è senz'altro più rapido e poco invasivo.

In questa ottica, abbiamo voluto effettuare uno studio nel cane, valutando il pelo come campione biologico per la determinazione dei livelli di cortisolo (hair cortisol concentration, HCC). Sono stati utilizzati 22 cani con SC al momento della diagnosi, 28 cani con patologie croniche (sick control dogs, SCD) ma senza SC e 40 cani sani.

EVALUATION OF HAIR CORTISOL IN THE DIAGNOSIS OF
HYPERCORTISOLISM IN DOGS

S. Corradini¹, P.A. Accorsi¹, A. Boari², V. Beghelli¹, M. Mattioli¹, P. Famigli-Bergamini¹ and F. Fracassi¹

Journal of Veterinary Internal Medicine 2013;27:1268-1272

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria, Bologna

²Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Teramo

ABSTRACT

Background: Measurement of hair cortisol is a noninvasive technique used for several purposes in humans and in animals.

Objectives: To measure hair cortisol concentrations (HCC) in dogs with spontaneous hypercortisolism (HC) and determine whether it can represent a useful diagnostic test for this syndrome.

Animals: Twenty-two dogs with spontaneous HC before treatment, 28 sick control dogs (SCD), and 40 healthy dogs.

Methods: In this prospective, observational clinical study, the HCC was measured by an RIA assay after extraction in HC dogs, in dogs with other chronic diseases, and in healthy dogs. The diagnostic accuracy of HCC was evaluated by subjecting data from dogs with HC and dogs with other chronic diseases to receiver operating characteristic (ROC) curve analysis.

Results: Median (range) cortisol concentration in dogs with HC was 4.53 pg/mg (0.32–74.62 pg/mg) and was significantly higher than in SCD (1.49 pg/mg, 0.13–14.19 pg/mg) and healthy dogs (1.28 pg/mg, 0.34–5.38 pg/mg). Within the 3 groups, there was a large overlap of HCC. The area under the ROC curve was 0.80 (95% CI: 0.67–0.92). A cut-off value of HCC of 1.93 pg/mg revealed 91% sensitivity and 61% specificity to diagnose HC.

Conclusions and Clinical Importance: Hair cortisol concentrations are higher in dogs with HC compared to SCD and healthy dogs. It is a noninvasive technique that should be further investigated as a possible diagnostic procedure for the diagnosis of HC in dogs.

INTRODUCTION

The use of noninvasive techniques to assess the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity has recently aroused great interest in humans. Measurements of cortisol in serum, urine, and saliva reflect

systemic cortisol concentrations at the time of sample collection or shortly before collection but cannot assess past cortisol levels.¹ Hair cortisol concentrations (HCC) are assumed to reflect integrated cortisol secretion over a period of several months in people, and might provide a sensitive marker for stress-associated endocrine changes.² In rhesus monkey HCC increases in response to major life stressors.³ There is a significant correlation between HCC and mean salivary cortisol concentrations provided to support the validity of HCC as an index of long-term cortisol secretion.

There is a validated method to measure cortisol concentrations in canine hair.⁴ Although the mechanism of cortisol incorporation into the hair is not fully understood, measurement of HCC permits evaluation of chronic stress in both humans and animals.

Cushing's syndrome (CS), also known as hypercortisolism (HC), consists of signs caused by prolonged exposure to increased glucocorticoid levels. There is higher HCC in CS patients compared to healthy controls¹. The identification of markedly elevated HCC in Cushing's patients was confirmed by the results of a more recent study.² A diagnosis of HC in dogs is currently based on clinical signs, laboratory findings, and the results of the low-dose dexamethasone suppression test (LDDS test), the ACTH stimulation test (ACTH test), and an increase in the urine cortisol-to-creatinine ratio or various combinations.⁵ However, such tests are time consuming and invasive, and some owners find it difficult to collect the urine sample. The development of a noninvasive method requiring sample material that is easy to collect and store would be an advantage in the diagnosis of HC in dogs.

The aim of the study was to measure HCC in dogs with HC and determine whether it can represent a useful diagnostic test for this syndrome. For this purpose, the HCC in healthy dogs, in dogs with HC, and in a group of sick control dogs were compared.

Materials and Methods

Approval for this study was given by the Scientific-Ethics Committee, University of Bologna, Italy.

Healthy Dogs.

Forty clinically healthy dogs, consisting of 14 females (12 spayed) and 26 males (7 neutered), were used. They ranged from 7 to 15 years in age (median, 10 years). Breeds included Epagneul Breton (n = 1), Bracco Italiano (1), Dalmatian (1), Siberian Husky (1), Maremma Sheepdog (1), Pointer (1), Rottweiler (1), Italian short haired Segugio (1), English Setter (1), Wirehaired Pointing Griffon (1) and mixed-breed dogs (30). The dogs were considered healthy based on the medical history and results of a physical examination.

Dogs with HC

Twenty-two dogs with HC were included in the study. They consisted of 12 females (8 spayed) and 10 males (1 castrated), which ranged in age from 6 to 16 years (median, 12 years). Breeds included Boxer (n = 2), Dachshund (2), Miniature Schnauzer (2), Bolognese (1), Wire-haired Dachshund (1), Coton de Toulear (1), Maltese (1), Italian Segugio (1), Yorkshire Terrier (1) and mixed-breed dogs (10). Hematological, urinary and biochemical analyses, ACTH stimulation test and ultrasonographic examination of the adrenal glands were carried out in all dogs. Low-

dose dexamethasone suppression test was performed in 16 dogs and endogenous ACTH was measured in 11 dogs. Dogs were included in the study when clinical and laboratory findings were consistent with HC, the LDDS test and/or ACTH test were positive for HC, treatment with trilostane or adrenalectomy resulted in an adequate response, and no other treatments had been administered. A diagnosis of pituitary-dependent hypercortisolism (PDH) or adrenal-dependent hypercortisolism (ADH) was based on the ultrasonographic appearance of the adrenal glands, the results of the LDDS test and concentrations of endogenous ACTH. Pituitary-dependent HC was diagnosed in 17 dogs and ADH in 5. All dogs with HC were consecutively enrolled at the time of diagnosis before treatment.

Sick Control Dogs (SCD)

Twenty eight sick dogs were included in the study. The SCD were dogs older than 6 years consecutively admitted when illness was first diagnosed. They consisted of 15 females (8 spayed) and 13 males (3 castrated), which ranged in age from 6 to 15 years (median 10 years). Breeds included Siberian Husky (n=3), Border Collie (2), Medium Schnauzer (2), Miniature Poodle (2), Airedale Terrier (1), Bearded Collie (1), Boxer (1), Cairn Terrier (1), English Setter (1), Terranova (1), Volpino Italiano (1) and mixed-breed dogs (12). The diseases of the dogs included diabetes mellitus (6), non-classified neoplasia (3), heart failure (3), hypothyroidism (2), diabetic ketoacidosis (2), pyometra (2), chronic hepatopathy (2), chronic kidney disease (1), prostatic carcinoma (1), pancreatitis (1), dirofilaria immitis infection (1), insulinoma (1), thyroid neoplasia (1), liver neoplasia (1), osteosarcoma (1), mammary carcinoma (1), protein losing enteropathy (1), hypoglycemic syndrome (1) and prosencephalic syndrome (1). Four dogs had more than one disease at the same time. Dogs that had received glucocorticoids within previous 60 days were not enrolled.

Sample Collection and endocrine tests

Hair samples were collected from the xiphoid region by shaving with an electronic shaver to the level of skin for each dog. The shaving area was about 9 to 10 cm².

Hair samples were identified, labeled and stored at room temperature until analysis. Blood samples

for the determination of endogenous ACTH concentrations were collected from the jugular vein or cephalic vein into EDTA-coated plastic tubes placed on ice. The samples were immediately centrifuged at 4°C, 500 x g for 8 minutes, and plasma was immediately transferred to plastic tubes and stored at -80°C until analysis. ACTH stimulation test and

LDDS test were performed by injecting intravenous tetracosactide esacetate^c and dexamethasone^d, respectively, as previously described.⁵

Extraction from hair and hormone determinations

The extraction of the cortisol from the hair was performed as described by Accorsi et al. (2008).⁴ Hair was first minced into 1-3 mm length fragments and 60 mg of trimmed hair was placed in a glass vial. Methanol (concentration $\geq 99.9\%$) was added and the vials were incubated at $+50^{\circ}\text{C}$ by gentle shaking for 18 h. The vials' contents were then filtered to separate the liquid phase. The latter was evaporated to dryness under an air-stream suction hood at 37°C and dry residue was then dissolved into PBS 0.05M, pH 7.5. Cortisol concentrations were determined by RIA based on ^3H -steroid by competitive adsorption.⁶ Analysis was performed in duplicate. Parameters for the analysis validation were: sensitivity 0.26 pg/mg, intra-assay variability 6.8%, inter-assay variability 9.3%, specificity (%): cortisol 100, corticosterone 9.5, 11α -hydroxy-progesterone 8.3, cortisone 5.3, 11α -desoxicortisol 5.0, progesterone 0.6, desoxicorticosterone 0.5, 20α -dihydrocortisone 0.4, testosterone 0.3, aldosterone 0.1, dehydroepiandrosterone, 5α -pregnenolone, 17β -estradiolo, cholesterol <0.0001 . All of the concentrations were expressed in pg/mg of hair shaft.

Serum cortisol and plasma ACTH concentrations were determined with kits^{ab} that have been validated previously for use in dogs.^{7,8}

Statistical analysis

Results were analyzed by non-parametric statistics.^{e,f} Median and ranges are given. Kruskal- Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test was performed to compare data from dogs with HC, SCD and healthy dogs. Categorical data were compared by Fisher's exact test or χ^2 - test depending on the number of cases in each group. Mann-Whitney U-test was performed to determine whether dogs with PDH or ADH differed significantly in terms of HCC. The correlations between HCC and pre- and post ACTH serum cortisol concentrations were determined using Spearman's test. A receiving operating characteristic (ROC) curve was used to determine the area under the curve (AUC) and select the optimum HCC cut-off values to diagnose or exclude a state of HC. Ninety-five percent confidence intervals were calculated for ROC curves. A p value < 0.05 was considered significant.

Results

Age, sex, neutered status and breed distribution were not significantly different between groups. Median body weight in dogs with HC (10.2 kg, range 3.1-45.7 kg) was significantly ($p = 0.03$) lower compared to SCD (23.5 kg, range 5.0-55.6 kg). Hair cortisol concentration was 4.53 pg/mg (0.32-74.62 pg/mg),

1.49 pg/mg (0.13-14.19 pg/mg) and 1.28 pg/mg (0.34-5.38 pg/mg) in dogs with HC, SCD and healthy dogs, respectively. Hair cortisol concentrations in dogs with HC was significantly higher ($p < 0.001$) compared to SCD and healthy dogs. There was a great deal of overlap in HCC between groups (Fig. 1). No significant differences in HCC between SCD and healthy dogs were observed. Hair cortisol concentrations in dogs with PDH (5.13 pg/mg, 0.32-74.62 pg/mg) were not significantly different ($p = 0.87$) from dogs with adrenal-dependent HC (3.94 pg/mg, 2.10-21.76 pg/mg). No correlations were found between HCC and basal serum cortisol concentrations ($p=0.85$) nor between HCC and post ACTH serum cortisol values ($p=0.46$). Figure 2 shows the ROC curve for the HCC. The area under the ROC curve was 0.80 (95%CI: 0.67 to 0.92). A cut-off value of HCC 1.93 pg/mg revealed 91% sensitivity (95% CI: 70.8 to 98.9) and 61% specificity (95% CI: 40.9 to 78.5) with a positive likelihood ratio and a negative likelihood ratio of 2.55 and of 0.14 to diagnose HC.

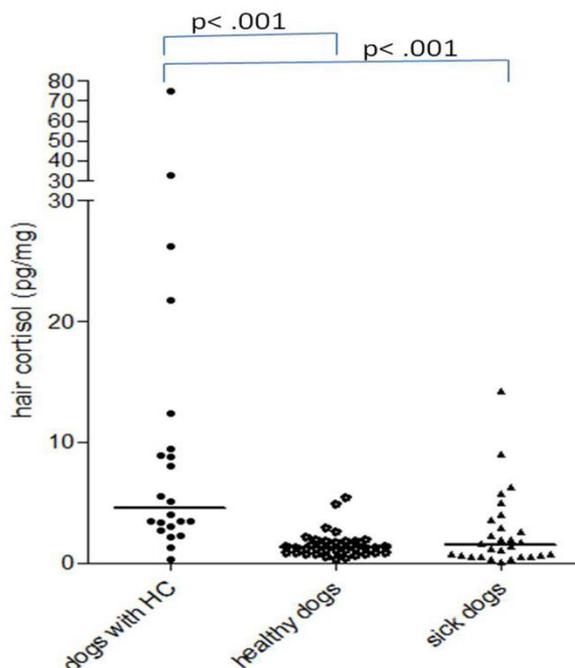


Figure 1: Hair cortisol concentrations (HCC) in dogs with hypercortisolism (HC) (n=22), healthy dogs (n=40) and sick control dogs (SCD) (n=28). Dogs with HC have significantly higher HCC

than healthy dogs and SCD.

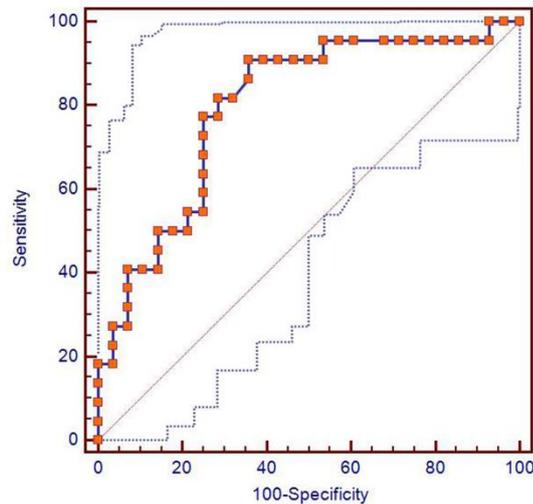


Figure 2: Receiver operating characteristics (ROC) curve for the hair cortisol concentrations when used to distinguish between dogs with hypercortisolism and sick control dogs. The line with the red squares is the ROC curve and the dashed gray lines represent the 95% confidence interval. The solid central line represent the null hypothesis (area under the ROC curve = 0.5).

Discussion

The present study indicates that HCC is significantly higher in dogs with HC compared to SCD and healthy control dogs. This findings support the hypothesis that increased hair cortisol levels reflect excessive endogenous cortisol secretion and are in accordance with studies performed in humans where the CS patients could be distinguished from healthy controls based on their HCC.^{1,2} Interestingly, it was shown in human studies that the HCC moved parallel to the clinical course of disease and that HCC levels decreased after treatment.^{1,2} In our study we measured HCC only at the time of diagnosis of HC; therefore, further evaluations are needed to investigate whether the treatment of HC produces a decrease of HCC in dogs. Hair samples were collected from the xiphoid region for a practical reason and for better compliance of the owners. Abdominal ultrasonography is commonly performed in the diagnostic work-up of dogs with HC and to perform such procedure the abdominal region is usually shaved; furthermore, hair that is shaved in the xiphoid region does not produce any evident esthetic damage to the dog.

In humans, hair growth patterns vary across different regions of the scalp, which could potentially influence the HCC.⁹ It is unknown if in dogs the hair growth and HCC levels are different if measured in other regions of the body; further studies are needed to investigate such hypothesis.

The AUC measures the probability of a correct diagnostic classification, and the value of 0.80 found in the present study indicates a moderately discriminative power. The sensitivity at HCC 1.93 pg/mg was 91% (95% CI: 70.8 to 98.9%). Accordingly, the specificity at HCC 1.93 pg/mg was only 61% (95% CI: 40.9 to 78.5%). In the light of these findings, to overcome low specificity, HCC seems to be a non-invasive technique that could be used in dogs with a high suspicion of HC.

In human medicine, the analysis of cortisol in hair constitutes a highly promising method for the retrospective assessment of integrated cortisol secretion over extended periods of time⁹ and segmental analysis of the hair can provide historical information of the patient for some months before the time of sampling.¹ One study performed in healthy dogs was unable to find any significant differences in the HCC between the proximal and the distal hair sections.¹⁰

An important point in this respect concerns the question of whether local cortisol production in the hair follicle also adds to HCC. In guinea pigs a study showed that only very limited amounts of systemically administered radioactive cortisol were deposited in the hair, while at the same time large amounts of unlabeled glucocorticoids could be found.¹¹ This strongly suggests local production in hair follicles. Therefore it is still unsure to which extent for example local skin irritation alters glucocorticoid levels in hair and further studies on this topic are needed. Indeed in humans, the hair follicle (*in vitro*) itself is effective at producing cortisol following CRH stimulation and thus is equivalent to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. However, evidence from studies showing a close correspondence between HCC and conditions with well-defined changes in classical hypothalamic-pituitary-adrenal axis components supports the notion that HCC sensitively reflects systemic cortisol levels and, in turn, may only be marginally influenced by local cortisol production.¹²

Hypercortisolism is reported to have predominance of hairless and atrophic telogen follicles¹³ and this aspect could potentially influence the HCC. Further studies aimed to evaluate the influence of the hair cycle on HCC are recommended. The present study had a number of limitations, such as the lack of evaluation of the color of the hair sampled. One study found a relationship between hair color and HCC in healthy dogs; eumelanin (black) hairs are lower in cortisol than pheomelanin (yellow) hairs.¹⁰ We do not know whether the color of hair sampled was homogeneous in the 3 groups of dogs tested here. However

since animals were randomly selected and no breed within each group was overrepresented, it is unlikely that a specific hair color would have been significantly more present in one group. Moreover it is not known if the color of the hair, like in healthy dogs, also influences the HCC in sick dogs and in dogs with HC. Furthermore the mild influence of the hair color, unlikely would change the clinical interpretation of the HCC in dogs with HC. Another limitation is that we did not evaluate the washing procedures prior to sample collection. Frequent washing procedures may partially influence HCC in humans,⁹ but is unknown if a similar condition is present in dogs. However the substantial lower frequency of hair washing procedure in dogs compared to humans, makes improbable that this aspect could significantly influence the HCC in dogs.

As with other screening tests for HC, HCC cannot differentiate dogs with PDH from dogs with ADH. Other tests, such endogenous plasma ACTH determination, the LDDS test, high dose dexamethasone suppression test and diagnostic imaging, are helpful in making this distinction.⁵ In conclusion, this is the first study to document that hair cortisol levels are high in dogs with HC. The main advantage of this method is that hair sampling is an easy procedure. Hair cortisol concentrations were significantly higher in HC dogs compared to healthy dogs and SCD, but a large overlap of results was observed. Because of the lack of specificity, this test could be considered a noninvasive procedure only in dogs with a high suspicion of HC.

FOOTNOTES

^a Immulite cortisol, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA

^b Immulite ACTH, Diagnostic Product Corporation, 234 Los Angeles, CA

^c Synacthen,; Novartis, Origgio, Italy.

^d Dexadreson, dexamethasone phosphate, 2 mg/ml; Intervet, Peschiera Borromeo, Italy.

^e GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., San Diego, CA

^f MedCalc 10.2.0.0, Mariakerke, Belgium

References

- 1- Thomson S, Koren G, Fraser L.-A, et al. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's Syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010;**118**:133-138.
- 2- Manenschijn L, Koper JW, Lambert SWJ, van Rossum EFC. Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids* 2011;**76**:1032-1036.
- 3- Davenport MD, Tiefenbacher S, Lutz CK, et al. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *Gen Comp Endocrinol* 2006;**147**:255-261.
- 4- Accorsi PA, Carloni E, Valsecchi P. Cortisol determination in hair and feces from domestic cats and dogs. *Gen Comp Endocrinol* 2008;**155**:398-402.
- 5- Feldman EC, Nelson RW. Canine hyperadrenocorticism (Cushing's Syndrome). In: Feldman EC, Nelson RW, ed. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. St Louis: Saunders; 2004:252-357.
- 6- Fenske M, Schonheiter H. Thin-layer chromatography on silicacoated aluminum sheet as an adjunct to radioimmunoassay of steroids. *J Chromatogr Biomed Appl* 1991;**563**:178-183.
- 7- Singh AK, Jiang Y, White T, Spassova D. Validation of nonradioactive 254 chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats and horses. *J Vet Diagn Invest* 1997;**9**:261-268.
- 8- Scott-Moncrieff JC, Koshko MA, Brown JA, et al. Validation of a chemiluminescent enzyme immunometric assay for plasma adrenocorticotrophic hormone in the dog. *Vet Clin Pathol* 2003;**32**:180-187.
- 9- Stalder T, Kirschbaum C. Analysis of cortisol in hair - State of the art and future directions. *Brain Behav Immun* 2012;**26**:1019-1029.
- 10- Bennett A, Hayssen V. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs; coat color and pigment differences. *Domest Anim Endocrinol* 2010;**39**:171-180.
- 11- Keckeis K, Lepschy M, Schöpfer H et al. Hair cortisol: a parameter of chronic stress? Insights from a radiometabolism study in guinea pigs. *J Comp Physiol B* 2012;**182**:985-986.
- 12- Ito N, Ito T, Kromminga A et al. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)axis and synthesize cortisol. *FASEB J* 2005;**19**:1332-1334.
- 13- Gross TL, Ihrke PJ, Waider EJ et al. Atrophic diseases of the adnexa. In: *Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopatologic Diagnosis*. Oxford: Blackwell; 2005:480-517.

Capitolo 5

VALUTAZIONE DEL CORTISOLO BASALE PER IL MONITORAGGIO DELLA TERAPIA CON TRILOSTANO IN CANI AFFETTI DA IPERCORTISOLISMO SPONTANEO

S.Corradini, F.Bresciani, M.Pietra, O.Peta, F.Fracassi

57

72°Congresso Internazionale SCIVAC Marzo 2012

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Scuola di Agraria e
Medicina Veterinaria, Bologna

SCOPO DEL LAVORO

Il trilostano è un inibitore enzimatico competitivo della 3 β -idrossisteroide-deidrogenasi (3 β -HSD) ed è l'unico farmaco approvato in Italia per la terapia della sindrome di Cushing (ipercortisolismo) del cane. Il monitoraggio terapeutico prevede l'esecuzione del test di stimolazione con ACTH; la concentrazione del cortisolo post-ACTH (T1) è il parametro comunemente utilizzato per l'adeguamento della dose di farmaco. L'obiettivo di questo studio è quello di valutare se il livello di cortisolo basale (T0) possa essere un utile parametro ed eventualmente sostituirsi al test di stimolazione con ACTH per il monitoraggio terapeutico di cani in terapia con trilostano.

MATERIALI E METODI

Nel presente lavoro sono stati analizzati i risultati dei test di stimolazione con ACTH di cani affetti da ipercortisolismo spontaneo in terapia con trilostano (Vetoryl®), nel periodo compreso tra Marzo 2006 e Marzo 2011. In tutti i soggetti, il trilostano veniva somministrato ad un dosaggio di partenza di 2-5 mg/Kg q12 o q24h. I test di stimolazione con ACTH sono stati eseguiti tra le 2 e le 3 ore dalla somministrazione del farmaco, valutando la cortisolemia sierica prima e dopo la somministrazione IV o IM di 0,25 mg di tetracoside sintetico (Synacthen®). L'adeguamento del dosaggio di trilostano è stato effettuato valutando la risposta clinica e considerando ideali valori di T1 compresi tra 1,4 e 5,4 μ g/dL. La cortisolemia è stata misurata con metodica immunologica di tipo competitivo validata per la specie canina (Immulite® Cortisol, Diagnostic Products Corporation, USA). I dati sono stati sottoposti a valutazione statistica mediante un software commerciale (MedCalc®) utilizzando il coefficiente di correlazione di Pearson e curve di ROC. La significatività è stata posta per $p < 0,05$.

RISULTATI

Duecentocinquantatré test di stimolazione con ACTH di 59 cani affetti da sindrome di Cushing sono stati inclusi nel presente studio. I valori di T0 risultavano compresi tra 0,20-20,50 μ g/dL (mediana, 2,30 μ g/dL) e T1 compreso tra 0,20-33,30 μ g/dL (mediana, 4,60 μ g/dL). Una correlazione statisticamente significativa ($r=0,69$; $P < 0,0001$) è stata riscontrata fra le concentrazioni di cortisolo pre e post-ACTH. Attraverso l'utilizzo delle Curve di ROC è stato possibile correlare i valori di cortisolo T0 con quelli post-ACTH al fine di ottenere un intervallo di cortisolo basale che si correlasse al meglio con il range ritenuto ottimale per il cortisolo T1. Il risultato di tale analisi mostra un intervallo del cortisolo T0

compreso tra 1,2-2,6 μ g/dL. In 107/253 (42%) campioni il valore di cortisolo T1 era compreso tra 1,4-5,4 μ g/dL di questi 107 in 51 (48%) campioni anche il valore di cortisolo basale risultava compreso tra 1,2-2,6 μ g/dL. Valori di cortisolo post-ACTH <1,4 μ g/dL sono stati riscontrati in 40/253 (16%) campioni di questi 40 in 30 (75%) campioni si riscontrava un valore di cortisolo T0<1,2 μ g/dL. In 106/253 (42%) campioni sono stati evidenziati valori di T1>5,4 μ g/dL di questi 106 in 76 (72%) si rilevava un cortisolo basale >2,6 μ g/dL (72%). Una concentrazione di T0<1,2 μ g/dL è stata rilevata in 58/253 (23%) campioni; considerando il valore T1 come gold-standard, il valore di T0<1,2 risultava avere un valore predittivo negativo (VPN) del 95% (p<0,0001). Valori di cortisolo T0>2,6 μ g/dL sono stati evidenziati in 111/253 (44%) campioni; considerando il valore T1 come ottimale, il valore T0>2.6 μ g/dL risultava avere un valore predittivo negativo (VPN) del 78% (p<0,0001).

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio mettono in evidenza l'esistenza di una correlazione tra le concentrazioni di cortisolo T0 e T1. In un simile studio condotto da Cook e coll. (2010) gli autori affermano che il riscontro di valori di cortisolo T0 nell'intervallo compreso tra 1,3-2,9 μ g/dL permette di giudicare, come adeguato il controllo della funzionalità surrenalica; al contrario dai nostri dati emerge che la singola valutazione del cortisolo basale non rappresenta un efficace parametro per il monitoraggio della terapia con trilostano. Tuttavia, analogamente a quanto riportato da a Cook e coll. (2010), anche i nostri risultati permettono di affermare che valori di cortisolo T0>1,2 μ g/dL consentono, con buona approssimazione, di escludere un sovradosaggio del farmaco. E' possibile quindi concludere che, sulla base dei risultati del nostro studio, l'esecuzione del test di stimolazione con ACTH rimane la metodica di riferimento per il monitoraggio della terapia con trilostano in cani affetti da sindrome di Cushing.

BIBLIOGRAFIA

-Cook AK, Bond KG(2010): Evaluation of the use of baseline cortisol concentration as a monitoring tool for dogs receiving trilostane as a treatment for hyperadrenocorticism. *JAVMA* 237;801-805.

-Daminet S, Fracassi F, Furlanello T, Graham P, Holland F, Kooistra HS, Neiger R, Reusch CE, Rosenberg D, Simons FA; Consensus Meeting , Amsterdam 19 Aprile, 2006.

-Galac S, Buijtels JJCWM, Kooistra HS(2009):Urinary corticoid:creatinine ratios in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism during trilostane treatment. *J Vet Intern Med*; 23:1214-1219.

-Rijnberk A, Kooistra HS(2010): Adrenals.Clinical Endocrinology of Dogs and Cats. Schlutersche;93-154.

Capitolo 6

FATTORI PROGNOSTICI ALLA DIAGNOSI IN CANI AFFETTI DA IPERCORTISOLISMO IPOFISI-DIPENDENTE

Introduzione

Nonostante la SC sia una delle endocrinopatie più diffuse nel cane, i fattori prognostici sono ancora largamente sconosciuti e gli studi presenti si focalizzano in gran parte sugli aspetti eziopatogenetici e terapeutici. Piuttosto scarse sono le informazioni da un punto di vista prognostico presenti nei soggetti con SC e sottoposti a terapia medica con trilostano. Fornire informazioni prognostiche accurate permetterebbe di garantire una maggior motivazione nel proprietario per intraprendere un trattamento terapeutico costoso e di lunga durata. Con l'obiettivo di valutare il valore prognostico delle diverse variabili cliniche e laboratoristiche al momento della diagnosi in cani successivamente trattati con trilostano abbiamo condotto uno studio retrospettivo. Nello studio sono stati inclusi 85 soggetti in cui per la prima volta, tra Luglio 2001 e Ottobre 2013, fosse stata eseguita una diagnosi di PDH; tutti i cani sono successivamente stati trattati con trilostano e sono stati monitorati nel tempo da un punto di vista terapeutico. Tutti i proprietari sono stati contattati telefonicamente per indagare la data e la causa di morte. Sono state valutate diverse variabili cliniche e laboratoristiche al momento della diagnosi incluso: l'anamnesi, la razza, il sesso, il peso, i segni clinici, la pressione sistolica, l'esame emocromocitometrico e il profilo biochimico, l'analisi delle urine con valutazione dei rapporti proteine urinarie:creatinina (UPC) e albumine urinarie:creatinina (UAC), il test di stimolazione con ACTH, il test di soppressione a basse dosi di desametasone (LDDSt), la concentrazione di ACTH endogeno e l'ecografia addominale.

PROGNOSTIC FACTORS IN DOGS WITH NEWLY DIAGNOSED
PITUITARY DEPENDENT HYPERCORTISOLISM

F. Fracassi¹, S. Corradini¹, D. Floriano¹, A. Boari², M. Pietra¹, P. Famigli
Bergamini¹, F. Dondi¹

The Veterinary Record, inviato alla rivista, in fase di revisione

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Scuola di Agraria e Medicina
Veterinaria, Bologna

²Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Teramo

Summary

Pituitary dependent hypercortisolism (PDH) is one of the most frequent endocrinopathies in dogs but prognostic factors are largely unknown. The aim of this retrospective case series study was to determine the prognostic value of different clinical and clinicopathological variables evaluated at the time of diagnosis, before treatment, in dogs with newly diagnosed PDH subsequently treated with trilostane. Medical records from one referral center were evaluated. Eighty-five dogs with PDH were included. The median survival time was 852 days (range, 2 to 3,210 days). 84% lived more than 6 months, 70% more than 1 year, 54% more than 2 years and 29% more than 3 years. Survival time for older dogs (HR 1.24, IC 95% 1.09-1.40) and for dogs with higher serum phosphate concentrations (HR 1.35, IC 95% 1.01-1.81) was shorter. Serum phosphate concentrations were above the reference range in 44% of animals. Proteinuria, systolic hypertension and presence of concomitant disorders were not associated with survival time. In conclusion dogs with newly diagnosed PDH treated with trilostane had a far to good prognosis. Hyperphosphatemia is a common finding in newly diagnosed PDH dogs and represents a negative prognostic factor.

Introduction

Spontaneously occurring hypercortisolism (HC), or Cushing's syndrome is defined as the combination of physical and biochemical changes that results from chronic and pathologic high concentrations of circulating glucocorticoids. In most of the cases HC is due to inappropriate secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from the hypophysis (pituitary dependent-hypercortisolism [PDH]) or caused by a primary adrenal disorder (adrenal dependent hypercortisolism [ADH]). PDH accounts for 85% of cases (Feldman 1983).

The excess of glucocorticoids determines various clinical signs, which are reviewed elsewhere (Feldman and Nelson 2004). The majority of clinical signs have a considerable impact on the animal's quality of life; this condition is therefore usually treated and there are no studies on the causes of death in a large series of untreated cases.

PDH is most commonly treated medically, despite surgical options have been published (Meij and others, 1998). The destruction of the adrenal cortex with mitotane (o,p'DDD) has long been the medical treatment of choice for PDH in dogs. Recently, trilostane(4,5-epoxy-17-hydroxy-3-oxoandrostan-2-carbonitrile), a competitive inhibitor of 3- β -hydroxysteroiddehydrogenase has gained increasing acceptance in the treatment of dogs

with PDH, and its efficacy has been reported in several studies (Neiger and others, 2002; Ruckstuhl and others, 2002, Alenza and others, 2007).

Despite pathophysiologic features, clinical aspects, diagnostic procedures and treatment options for dogs with PDH have been extensively reported, only in a few studies (Hertog and others 1999, Neiger and others 2002, Barker and others 2005, Perez-Alenza and others 2006, Clemente and others 2007, Hanson and others 2007) are mentioned the live expectancy and/or prognostic factors of the disease in dogs treated with trilostane.

Precise data about outcome and prognostic factors of PDH in dogs would help to better characterize the disease and, possibly, increase owner's willingness to accept treatment for their dogs and maintain compliance. Therefore, the aim of the present study was to determine the survival time and the prognostic value of different variables retrieved from history, signalment, physical examination and laboratory evaluations in a population of newly diagnosed dogs with PDH subsequently treated with trilostane.

Materials and Methods

Inclusion criteria

Medical records of all dogs with spontaneous HC admitted to the Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna (Italy), between March 2003 and October 2013 were evaluated. Dogs were included in the study if they had newly diagnosed PDH, had not been treated for HC, were subsequently treated with trilostane and had follow up examinations until death or until the last re-evaluation for which record were evaluable. Dogs were excluded if, at diagnosis, the owner declined a complete diagnostic work up or if the dogs were previously treated by private veterinarians. Dogs with ADH were also excluded.

Dogs were included in the study when clinical and laboratory findings were consistent with HC, the low dose dexamethasone suppression test (LDDS test) and/or ACTH stimulation test were positive for HC, subsequent treatment with trilostane resulted in an adequate response, and no other treatments for HC had been previously administered. A diagnosis of PDH or ADH was based on the ultrasonographic appearance of the adrenal glands, the results of the LDDS test and concentrations of endogenous ACTH.

Medical records review

Data obtained at the time of diagnosis from the medical records comprised, breed, sex, body weight, age, history, physical examination findings, systolic blood pressure, routine haematology, biochemistry profile, urinalysis including urinary protein:creatinine ratio (UPC), ACTH stimulation test, LDDS test, endogenous ACTH concentration and abdominal ultrasonography. Any concurrent disease diagnosed at initial evaluation and the trilostane treatment dose and regimen (q24 or q12h) were recorded. Date of death or survival to October 15, 2013 was also recorded. When necessary owners and/or referral veterinarians were contacted.

Diagnostic procedures

ACTH stimulation test and LDDS test were performed by injecting intravenous tetracosactide esacetate (Synacthen, Novartis, Origgio, Italy) and dexamethasone (Dexadreson, Intervet, Peschiera Borromeo, Italy), respectively, as previously described (Feldman and Nelson 2004). Blood samples for the determination of endogenous ACTH concentrations were collected from the jugular vein or cephalic vein into EDTA-coated plastic tubes placed on ice. The samples were immediately centrifuged at 4°C, 500 x g for 8 minutes, and plasma was immediately transferred to plastic tubes and stored at -80°C until analysis.

Serum cortisol and plasma ACTH concentrations were determined with kits (Immulite cortisol and Immulite ACTH, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA) that have been validated previously for use in dogs (Singh and others 1997, Scott-Moncrieff and others, 2003).

Systemic blood pressure measurement was determined by means of either an oscillometric device (BP-88 Next, Colin Corporation, Japan or petMAP™ graphic, Ramsey Medical, Inc., Tampa, F, USA) or by doppler ultrasonic transducer (Minidop ES-100VX, Hadeco, Japan). The choice of method depended on the dog's body weight: doppler was employed in dogs <20 kg of body weight and the oscillometric method in the other subjects. Dogs were considered hypertensive whenever systemic blood pressure was found ≥ 160 mmHg.

Treatment protocol and monitoring of the treatment

Treatment with trilostane was started at the initial dose 1-6 mg/kg BW once or twice daily. The decision on dose regimen was the responsibility of the clinician managing the case. As standard procedure at our clinic, HC dogs had been reassessed at 10 days, 4, 8, 13,

24 weeks and then every 3 to 6 months. Each re-evaluation included an assessment of clinical signs (e.g., decreased polyuria, polydipsia, polyphagia), biochemical profile and an ACTH stimulation test performed between 2 and 3 hours after trilostane administration. The dose of trilostane was changed based on the results of the ACTH stimulation test and the clinical signs. When post-ACTH plasma cortisol concentration was <150 nmol/L, the dose was considered appropriate if the owner also reported resolution of the clinical signs of hypercortisolism, such as polyuria, polydipsia and polyphagia. When post-ACTH plasma cortisol concentration was >150 nmol/L, and/or the clinical signs of hypercortisolism persisted, the dose was increased and a new re-evaluation was scheduled 3 weeks later. Excessive clinical control was defined as clinical signs of hypoadrenocorticism and a post-ACTH cortisol concentration <40 nmol/L. Treatment was temporarily discontinued if patient showed clinical signs or serum electrolyte concentrations consistent with hypoadrenocorticism. When these signs had resolved, the dose was started back on treatment at a lower dosage.

Data analysis

Median survival time was obtained by a Kaplan-Meier product limit method. The survival time was defined as the interval between the first presentation and the date on which the dog was last known to be live, or the date of its death due to any cause. The following variables were investigated to determine their association with overall survival time: age, sex (male or female), reproductive status (intact or neutered), body weight, main clinical signs (polyuria, polydipsia, polyphagia, enlarged abdomen, weakness and dermatological abnormalities), systolic blood pressure, haematocrit (HCT), white blood cell (WBC) count, neutrophils count, lymphocytes count, monocytes count, eosinophils count, platelets count, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyl transferase (GGT), total bilirubin (Tot Bil), total serum protein (Tot Prot), albumin (Alb), cholesterol, blood urea nitrogen, creatinine, glucose, total calcium, inorganic phosphorus, sodium, potassium, chloride, basal and post ACTH cortisol, basal and 4 and 8 hours cortisol of LDDS concentrations, urinary specific gravity, UPC, presence of concurrent diseases and frequency of administration of trilostane (q24 vs q12). Weight and age were considered as continuous and binary variables based on median values (weight: ≤ 10 kg vs > 10 kg; age: ≤ 10 years vs > 10 years). Univariate Cox proportional hazards regression analyses were used to screen potential predictors for subsequent inclusion in a multivariable model. Variables with a value < 0.20

via univariate analysis were entered in the final model-building process. Variables then were removed one at a time until the model with the best fit was identified. In the model-building process, the selection of variables that were strongly collinear (ie, creatinine and urea concentrations) were also considered. Hazard ratio and 95% CIs were calculated. A receiving-operating characteristic (ROC) curve was used to select the optimum cut-off value of variables associate with survival in the multivariate analysis to discriminate dogs with short term survival from dogs with long term survival. The correlations between the various variables were performed using the Spearman's correlation. Data were analysed using a commercially available software program (MedCalc®). The significance level was set at $P < 0.05$.

Results

Of the 153 cases of canine HC that were retrieved from the records, 85 dogs fulfilled all of the inclusion criteria and were used in the analysis. Twenty six dogs were excluded because affected by ADH, 21 were excluded because the diagnosis had been made previously and they had been treated by private practitioners, 12 were excluded because owners denied permission for a comprehensive diagnostic evaluation and/or refused the treatment, 9 dogs were excluded because after a first period of treatment with trilostane they were subsequently treated with mitotane (5 dogs) or hypophysectomy (4 dogs).

Twenty five different breeds were included. The most commonly represented breeds were mixed breed (31), dachshund (10), boxer (9) and Yorkshire terrier (6). There were 27 entire females, 21 spayed females, 32 entire males and 5 castrated males. Median age at diagnosis was 10 years (range, 4 to 17 years). Median body weight was 10.0 kg with a range from 3.7 to 62.5 kg.

The most common clinical signs reported at diagnosis by the owners or observed at the physical examination were polyuria (86%), polydipsia (85%), polyphagia (85%), enlarged abdomen (66%), weakness (62%), and dermatological abnormalities (59%).

The descriptive statistic of values for continuous variables is presented in Table 1.

An ACTH stimulation test and LDDSt were performed at diagnosis in 83 and 67 dogs, respectively. The post ACTH cortisol concentration exceeded 600 nmol/L in 71 (85%) and the eight-hour post dexamethasone cortisol concentration exceeded 40 nmol/L in 59 (88%). The 81 dogs evaluated by abdominal ultrasonography all showed either bilateral mild adrenomegaly or normal adrenal glands.

Systemic blood pressure was found ≥ 160 mmHg in 77% of dogs. UPC was above the reference range in 61% of animals. One or more concurrent disorders were documented

in 20 (24%) of dogs, including 9 each with diabetes mellitus, 6 with hypothyroidism, 7 with other neoplasia not related to hypercortisolism, 2 with mitral valve endocardiosis and 1 with chronic bronchopathy. Trilostane was administered once or twice daily in 60 (71%) and 25 (29%) dogs, respectively.

At time of censorship, 14 were alive, 55 dead and 16 had been lost to follow up. Of the 55 dogs that died, 28 were euthanized and 27 died spontaneously. Of the 55 dogs that were dead at the time of censorship, the cause of death or reason of euthanasia were recorded when possible (Table 3). The cause of death was supported by necropsy only in 11 dogs.

Variable	Mean±SD	Median (range)	Interquartile range	Reference range
Age (y)	10.1±2.7	10.0 (4.3-16.9)	8.1-11.8	--
Body weight (kg)	14.3±10.9	10.0 (3.7-62.5)	7.5-16.7	--
White blood cells (x10 ³ /μl)	10.56±4.41	9.50 (5.00-29.30)	7.75-12.05	6.00-17.00.
Hematocrit (%)	49.1±7.0	49.0 (34.1-74.4)	44.2-53.6	37.0-55.0
Platelets (x10 ³ /μl)	445±185	420 (79-904)	309-665	160-500
Neutrophils (x10 ³ /μl)	8.57±4.29	7.50 (3.22-27.24)	6.03-9.84	3.00-12.00
Lymphocytes (x10 ³ /μl)	1.22±0.58	1.23 (0.10-3.10)	0.82-1.61	1.00-4.80
Monocytes (x10 ³ /μl)	0.64±0.45	0.57 (0.07-2.78)	0.34-0.76	0.10-1.40
Eosinophils (x10 ³ /μl)	0.14±0.18	0.07 (0.00-0.82)	0.00-0.19	0.00-0.75
AST (U/L)	43±24	36 (16-140)	27-50	20-42
ALT (U/L)	214±228	123 (18-1289)	79-292	20-55
Alkaline phosphatase (U/L)	1,453±2,002	798 (36-15,234)	369-1,711	42-180
GGT (U/L)	33±52	12 (0-263)	4-30	0-5.8
Total proteins (g/L)	66±7	67 (50-80)	61-72	56-79
Albumin (g/L)	33±5	34 (21-50)	31-36	28-37
Blood urea nitrogen (mmol/l)	11.7±9.9	9.2 (3.2-73.8)	7.1-12.2	6.4-19.6
Creatinine (μmol/L)	70.7±25.6	65.4 (34.4-204.2)	53-77.7	57.4-119.3
Glucose (mmol/l)	7.1±7.7	5.2 (3.3-43)	4.6-5.8	3.8-6.9
Calcium (mmol/l)	2.5±0.2	2.5 (1.8-3.0)	2.4-2.7	2.2-2.9
Phosphate (mmol/l)	1.5±0.3	1.5 (0.8-2.4)	1.2-1.7	0.8-1.5
Sodium (mmol/l)	147±4	148 (130-157)	145-150	143-154
Potassium (mmol/l)	4.9±0.6	5.0 (3.2-6.2)	4.5-5.4	3.9-5.3
Urinary specific gravity	1015±12	1012 (1002-1056)	1005-1022	>1035
Urinary protein to creatinine ratio	2.95±5.02	1.00 (0.10-26.30)	0.30-2.97	0.0-0.4
Sbp (mmHg)	176±33	180 (110-234)	152-205	<160

Table 1. Descriptive statistics of continuous variables in 85 dogs with newly diagnosed hypercortisolism

Reason for euthanasia/death	Number recorded
Cause that might be attributable to PDH:	21
• Preogerssive physical deterioration	7
• Neurological signs	12
• Pulmonary thromboembolism	2
Cause not attributable to PDH:	21
• Respiratory diseases (dyspnea)	2
• Heart diseases	1
• Renal insufficiency	1
• Gastric dilatation and volvulus	3
• Neoplasia	5
• Orthopedic disease	2
• Pyometra	1
• Diabetes mellitus	1
• Euthanasia because old age/deterioration	5
No cause recorded	13

Table 3. Reason for euthanasia/death for 55 dogs that had died by the time of censorship

The median survival time of the 85 dogs was 852 days (range, 2 to 3,210 days). 84% lived more than 6 months, 70% more than 1 year, 54% more than 2 years, 29% more than 3 years (Figure 1).

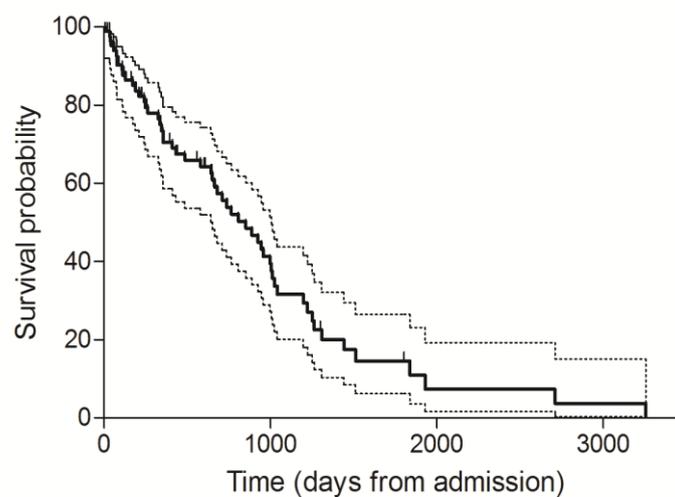


Figure 1. Kaplan-Maier survival curve for 85 dogs with newly diagnosed pituitary dependent hypercortisolism treated with trilostane. Solid line represents median survival time and dashed lines 95% CI.

Several variables showed a value of $P < 0.20$ on univariate Cox regression analysis, including age, body weight, platelets count, serum albumin, creatinine, blood urea nitrogen, alkaline phosphatase, phosphate and potassium concentrations (Table 2). Variables such as sex, neutered status, main clinical signs, systolic blood pressure, HCT, WBC, neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils count, serum AST, ALT, GGT, Tot Bil, Tot Prot, cholesterol, glucose, total calcium, sodium, potassium, chloride, basal and post ACTH cortisol, basal and 4 and 8 hours cortisol of LDDS concentrations, urinary specific gravity, UPC, presence of concurrent diseases and frequency of administration of trilostane were not associated with survival time.

Variable	Median survival time (d)	Hazard Ratio (95% CI)	P value
Age		1.11 (1.01-1.22)	0.024
Age (≤ 10 years vs > 10 years)	888 vs 737	1.52 (0.88-2.62)	0.131
Sex (female vs male)	807 vs 852	0.90 (0.52-1.55)	0.712
Neutered status (neutered vs intact)	711 vs 852	1.23 (0.70-2.17)	0.474
Body weight		1.02 (0.99-1.04)	0.135
Body Weight (≤ 10 kg vs > 10 kg)	852 vs 711	1.15 (0.66-2.98)	0.620
Concurrent diseases (absence vs. presence)	--	0.99 (0.53-1.85)	0.999
Systolic blood pressure		1.00 (0.99-1.01)	0.782
Systolic blood pressure (≤ 150 vs > 150)	997 vs 644	0.88 (0.32-2.43)	0.807
Trilostane regimen (SID vs BID)	766 vs 888	0.90 (0.41-1.95)	0.787
White blood cells	--	1.00 (0.99-1.00)	0.592
Hematocrit	--	0.98 (0.94-1.03)	0.433
Platelets	--	1.00 (1.00-1.00)	0.184
Neutrophils	--	1.00 (1.00-1.00)	0.712
Lymphocytes	--	0.99 (0.99-1.00)	0.321
Monocytes	--	1.00 (0.99-1.00)	0.868
Eosinophils	--	0.99 (0.99-1.00)	0.358
Aspartate aminotransferase	--	1.00 (0.99-1.01)	0.853
Alanine aminotransferase	--	0.99 (0.99-1.00)	0.533
Alkaline phosphatase	--	1.00 (1.00-1.00)	0.176
Gamma glutamyl transferase	--	0.99 (0.99-1.00)	0.502
Total proteins	--	0.81 (0.55-1.19)	0.279
Albumin	--	0.58 (0.33-1.03)	0.066
Blood urea nitrogen	--	1.01 (1.00-1.02)	0.012
Creatinine	--	2.77 (0.86-8.84)	0.086
Glucose	--	0.99 (0.99-1.00)	0.916
Calcium	--	0.79 (0.57-1.10)	0.268
Phosphate	--	1.22 (0.95-1.55)	0.113
Sodium	--	0.99 (0.94-1.05)	0.785
Potassium	--	1.50 (0.89-2.53)	0.129
Urinary specific gravity	--	0.99 (0.98-1.02)	0.983
Urinary protein/creatinine	--	1.01 (0.94-1.08)	0.778
Cortisol pre-ACTH	--	1.01 (0.96-1.06)	0.663
Cortisol post-ACTH	--	1.00 (0.99-1.02)	0.722
LDDSt: cortisol before dexamethasone		0.98 (0.92-1.05)	0.604
LDDSt: cortisol 4h after dexamethasone	--	1.02 (0.92-1.13)	0.675
LDDSt: cortisol 8h after dexamethasone	--	0.98 (0.89-1.09)	0.789

Table 2. Results of univariate analysis of factors potentially associated with survival time (days) in dogs with newly diagnosed hypercortisolism

On multivariable analysis only 2 variables retained a value of $P < 0.05$; age ($P=0.0009$, HR 1.24, IC 95% 1.09-1.40) and increased serum phosphate concentrations ($P=0.0424$, HR 1.35, IC 95% 1.01-1.81) at diagnosis were significantly associated with a shorter survival time. At diagnosis serum phosphate concentrations were above the reference range in 44% of cases. The ROC curve analysis showed that 1.45 mmol/l was the optimal cut-off of serum phosphate concentration to discriminate dogs with short term survival from dogs with long term survival. Median survival time evaluated by use of Kaplan-Maier analysis, was 983 days (range, 2 to 3210 days) in dogs with serum phosphate concentrations ≤ 1.45 mmol/l and 656 (range, 34 to 2670) in dogs with serum phosphate concentrations > 1.45 mmol/l (Figure 2) however the difference was not significant ($P = 0.2530$).

There was a significant positive correlation between the phosphate and ALT ($r=0.34$, $P=0.002$), post-ACTH cortisol ($r=0.30$, $P=0.009$), GGT ($r=0.33$, $P=0.003$), 4h cortisol of LDDSt ($r=0.40$, $P=0.001$) and 8h cortisol of LDDSt ($r=0.35$, $P=0.005$) concentrations. There was also a significant negative correlation between phosphate concentrations and lymphocytes ($r=-0.52$, $P<0.0001$) and eosinophils ($r=-0.29$, $P=0.01$) counts and between phosphate and total calcium ($r=-0.35$, $P=0.002$) concentrations. Age was positively correlated with creatinine ($r=0.39$, $P=0.0002$) and urea ($r=0.41$, $P=0.0001$) concentrations.

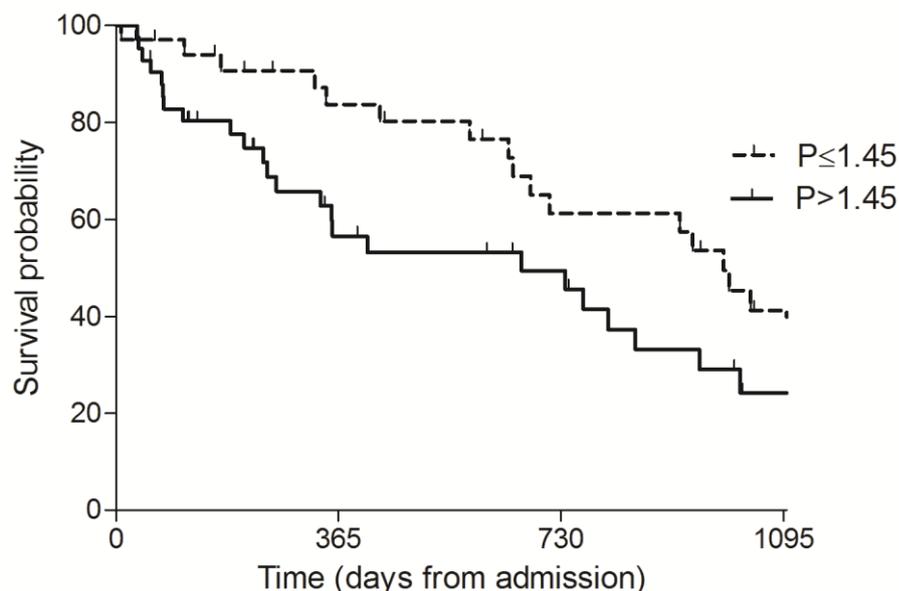


Figure 2. Overall survival in Kaplan-Maier survival curves differentiating two groups of dogs with newly diagnosed pituitary dependent hypercortisolism treated with trilostane according to initial serum phosphate concentrations (mmol/l). Survival time has been truncated at 3 years (1095 days).

Discussion

Dogs of the present study showed a survival time of 852 days. This result is in line with other studies where PDH dogs treated with trilostane survived 549 days (Neiger and others 2002), 662 days (Barker and others 2005), 930 days (Perez Alenza and others 2006) and 900 days (Clemente and others 2007). In the study performed by Neiger and others (2002), the survival time was noticeably shorter. However, this study was mainly aimed to evaluate the therapeutic efficacy of the treatment rather than to the survival times and there were only a few dead dogs at the end of the observation.

The age and serum phosphate concentrations were significantly associated with survival; therefore, at the time of diagnosis, older dogs and dogs with higher serum phosphate concentration had a shorter life expectancy. With regard to age, some previous studies have found the same statistical association (Barker and others 2005, Clemente and others 2007), likely because older dogs tend to have naturally lower life expectancy than younger dogs and are more susceptible to different diseases. As a matter of fact in the present study many dogs died of causes unrelated to the HC.

The results of this study support other studies that showed that serum phosphate concentrations are increased in dogs with hypercortisolism (Ramsey and others, 2005; Tebb and others, 2005; Corbee and others, 2012). Furthermore, it was previously observed that also the parathyroid hormone (PTH) is elevated in dogs with hypercortisolism (Ramsey and others, 2005; Tebb and others, 2005) but there is no direct correlation between the phosphate concentrations and the PTH concentrations (Ramsey and others, 2005). The treatment with trilostane results in a significant decrease of serum phosphate and PTH concentrations (Tebb and others, 2005). A recent study showed that PTH concentrations were not significantly different in 12 dogs with PDH (before and after hypophysectomy) and in control dogs (Corbee et al., 2012). As hypothesized in humans, this great variation in PTH concentrations measured in dogs with HC may be due to the clinical stage of disease, the degree/dose and duration of steroid excess, and the degree to which mineral metabolism is impaired (Kugai and others, 1986). The pathogenesis of hyperphosphatemia in dogs with HC, a condition that is not observed in humans with Cushing's disease (Findling and others, 1982; Faggiano and others, 2003), remains unknown. In the present study we observed that, at diagnosis, higher serum phosphate concentrations in dogs with PDH are associated with shorter survival times. Therefore, understand the reason of such phosphate abnormalities might have positive consequences for the management of the disease. Possible explanations for hyperphosphatemia are a reduced renal excretion of phosphate, an increased intestinal absorption of phosphate or

mobilization of phosphate from tissues (i.e. bones). The presence of hormones primarily involved in phosphorus regulation have been investigated in human patients and animal models with conditions characterized by severe derangements in phosphorus homeostasis. A number of hypophosphatemic peptides called “phosphatonins” have now been identified: fibroblastic growth factor 23 (FGF-23), FGFb7, matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), secreted related frizzled protein (sFRP-4), dentin matrix protein (DMP1), however FGF-23 remains the most thoroughly studied of these hormones as major regulator for the phosphorus. FGF-23 is synthesized and secreted primarily by osteocytes and osteoblasts in response to increased plasma phosphorus or calcitriol concentrations. In the kidney FGF-23 acts to regulate of the phosphorus and calcitriol homeostasis through the regulation of sodium-phosphorus type II co-transportes (NaPi-IIa and NaPi-IIc) and the vitamin D synthesis enzyme (25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase). In the parathyroid gland, FGF-23 acts to decrease PTH production and secretion. To bind to its receptor, FGF23 requires a co-factor, Klotho, which exist in both membrane and circulating forms. The kidney is the major source of Klotho, but Klotho expression is also found in other tissues, including the parathyroid and pituitary glands. Animals with klotho deficiency show signs of FGF23 deficiency with high serum phosphate and calcitriol concentration (Geddes and others 2013). In dogs with early chronic kidney disease the increase of phosphorus may drive an increase FGF23 and a decrease calcitriol concentrations, and it may therefore be enough to restore phosphorus homeostasis. In a recent study vitamin D concentration are normal in dogs with PDH (Corbee and others, 2012). Further studies aimed to investigate the role of FGF-23 and its receptors in the pathogenesis of hyperphosphatemia in dogs with PDH is recommended.

The present study has a number of limitations mainly related to the fact that is a retrospective study and incomplete records were occasionally present. The main limitation is that only in few dogs the dimension of the pituitary gland has been assessed by computed tomography or magnetic resonance imaging and for this reason this variable could not be included in the survival analysis. Pituitary adenomas in dogs can be classified, based on their size, as either non enlarged pituitaries containing microadenomas or enlarged pituitaries, which are also called macroadenomas (Kiupel and others, 2008). Although trilostane is effective in reliving clinical signs associated with HC, it doesn't affect the pituitary tumor. Dogs with a pituitary macro-adenoma have therefore a significant shorter survival time compared to dogs with micro-adenoma if not treated with radiotherapy (Kent and others, 2007) or other treatment options aimed to decrease the pituitary mass effect such as pituitary surgery (Hanson and others, 2007). Is therefore likely that in our study dogs with macroadenoma survived less than dogs with

microadenoma. A connection between the pituitary size and the serum phosphate concentrations has never been investigated and cannot be excluded. In enlarged pituitary adenomas the cell break down within the tumor could result in release of intracellular phosphate and determine hyperphosphatemia similarly to what happens during the tumor lysis syndrome. One recent study performed in dogs with PDH showed that plasma phosphate concentration was 1.6 ± 0.3 mmol/L before hypophysectomy and 1.4 ± 0.3 mmol/L after hypophysectomy (Corbee and others, 2012); the difference was not significant but the study was performed in only 12 dogs and therefore such difference might result significant if performed in a higher number of dogs. The possible connection between the dimensions of the pituitary masses and the serum phosphate concentrations is a pure speculation; however, in light of the prognostic importance of phosphatemia observed in this study a further study aimed to investigate such possible correlation is recommended.

In our study population UPC was increased in 61%, in accordance with other recent reports (71%) (Mazzi and others, 2008), (68%) (Smets and others, 2012). Proteinuria may promote progressive renal injury by several mechanisms that are described elsewhere (Bartges, 2012). From our results proteinuria seems not to influence the survival time in the study population. In proteinuric PDH dogs of one recent report, normalization or significant decrease of UPC has been observed in most of the cases subsequently treated with trilostane or hypophysectomy (Smets and others, 2012); this phenomena might prevent the progression of renal injury induced by proteinuria. Furthermore deaths related to renal diseases were uncommon in this study as well as in previous similar studies (Barker and others, 2005; Perez Alenza and others 2006; Clemente and others, 2007)

In conclusion most of the dogs with newly diagnosed PDH subsequently treated with trilostane survive more than 2 years. The survival time was shorter in older dogs and in dogs with elevated serum phosphate concentrations. At diagnosis, proteinuria, hypertension and the presence of concomitant diseases are not associated with decreased survival time.

References

- BARKER, E.N., CAMPBELL, S., TEBB, A.J., NEIGER, R., HERRTAGE, M.E., REID, S.W.J., RAMSEY, I.K. (2005) A comparison of the survival times of dogs treated with mitotane or trilostane for pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **19**, 810-815
- BARTGES, J.W. (2012) Chronic kidney disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **42**, 669-692
- CLEMENTE, M., DE ABDRES, P.J., ARENAS, C., MELIAN, C., MORALES, M., PEREZ-ALENZA, M.D. (2007) Comparison of non-selective adrenocorticolysis with mitotane or trilostane for the treatment of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The Veterinary Record* **161**, 805-809
- CORBEE, R.J., TRYFONIDOU, M.A., MEIJ, B.P., KOOISTRA, H.S., HAZEWINKEL, H.A.W. (2012) Vitamin D status before and after hypophysectomy in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. *Domestic Animal Endocrinology* **42**, 43-49
- FAGGIANO, A., PIVONELLO, S., MELIS, D., FILIPPELLA, M., DI SOMMA, C., PETRETTA, M., LOMBARDI, G., COLAO, A. (2003) Nephrolithiasis in Cushing's disease: prevalence, etiopathogenesis, and modification after disease cure. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**:2076-2080
- FELDMAN, E.C. (1983) Distinguishing dogs with functioning adrenocortical tumors from dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **183**, 195-200
- FELDMAN, E. C., NELSON, R. W. (2004) Canine hyperadrenocorticism (Cushing's Syndrome). In *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd edn. Eds E. C. Feldman, R. W. Nelson. St. Louis, Missouri, Saunders Elsevier. pp 252-357
- FINDLING, J.W., ADAMS, N.D., LEMANN, J.J., GRAY, E.W., THOMAS, C.J., TYRRELL, J.B. (1982) Vitamin D metabolites and parathyroid hormone in Cushing's Syndrome: relationship to calcium and phosphorus homeostasis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **54**, 1039-1044

- GEDDES, R.F., FINCH, N.C., SYME, H.M., ELLIOT, J. (2013) The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* **23**, 122-133
- HANSON, J.M., TESKE, E., VOORHOUT, G., GALAC, S., KOOISTRA, H., MEIJ, B.P. (2007) Prognostic factors for outcome after transsphenoidal hypophysectomy in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Neurosurgery* **107**, 830-840
- HERTOG, E.D., BRAAKMAN, J.C.A., TESKE, E., KOOISTRA, H.S., RIJNBERK, A. (1999) Results of non-selective adrenocorticolysis by o,p'-DDD in 129 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The Veterinary Record* **144**, 12-17
- KENT, M.S., BOMMARITO, D., FELDMAN, E.C., THEON, A.P. (2007) Survival, neurologic response, and prognostic factors in dogs with pituitary masses treated with radiation therapy and untreated dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **21**, 1027-1033
- KIUPEL, M., CAPEN, C., MILLER, M., SMEDLEY, R. (2008) Histological classification of tumors of the endocrine system of domestic animals. *World Health Organization international 285 histological classification of tumors of domestic animals, second series*. Charles Louis Davis DVM Foundation, Gurnee, Illinois vol. 12:17
- KUGAI, N., KOIDE, Y., YAMASHITA, K., SHIMAUCHI, T., NAGATA, N., TAKATANI, O. (1986) Impaired mineral metabolism in Cushing's syndrome: parathyroid function, vitamin D metabolites and osteopenia. *Endocrinologia Japonica* **33**, 353-359
- MAZZI, A., FRACASSI, F., DONDI, F., GENTILINI, F., FAMIGLI-BERGAMINI, P. (2008) Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Veterinary Research Communications* **32** (Suppl 1):S299-S301
- MEIJ, B.P., VOORHOUT, G., VAN DEN INGH, T.S.G.A.M., Hazewinkel, H.A., Teske, E., Rijnberk, A. (1998) Results of transsphenoidal hypophysectomy in 52 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Veterinary Surgery* **27**, 246-261
- NEIGER, R., RAMSEY, I., O'CONNOR, J., HURLEY, K.J., MOONEY, C.T. (2002) Trilostane treatment of 78 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The Veterinary Record* **150**, 799-804

-RUCKSTUHL, N.S., NETT, C.S., REUSCH, C.E. (2002). Results of clinical examinations, laboratory tests, and ultrasonography in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *American Journal of Veterinary Research* **63**, 506-512

-PEREZ ALENZA, D., ARENAS, C., LOPEZ, M.L., MELIAN, C. (2006) Long-term efficacy of trilostane administered twice daily in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of the American Animal Hospital Association* **42**, 269-276

-RAMSEY, I.K., TEBB, A., HARRIS, E., EVANS, H., HERRTAGE, M.E. Hyperparathyroidism in dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of Small Animal Practice* **46**, 531-536

-SINGH, A.K., JIANG, Y., WHITE, T., SPASSOVA, D. (1997) Validation of nonradioactive 254 chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats and horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **9**, 261-268

-SCOTT-MONCRIEFF, J.C., KOSHKO, M.A., BROWN, J.A., HILL, K., REFSAL, K.R. (2003) Validation of a chemiluminescent enzyme immunometric assay for plasma adrenocorticotrophic hormone in the dog. *Veterinary Clinical Pathology* **32**, 180-187

-SMETS, P.M.Y., LEFEBVRE, H.P., MEIJ, B.P., CROUBELS, S., MEYER, E., VAN de MAELE, I., DAMINET, S. (2012) Long-term follow-up of renal function in dogs after treatment for ACTH-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **26**, 565-573

-TEBB, A.J., ARTEAGA, A., EVANS, H., RAMSEY, K. (2005) Canine hyperadrenocorticism: effects of trilostane on parathyroid hormone, calcium and phosphate concentrations. *Journal of Small Animal Practice* **46**, 537-542

IPOFISECTOMIA TRANSFENOIDALE IN UN CANE CON IPERCORTISOLISMO DA MACROADENOMA IPOFISARIO

L. Pisoni, S¹. Del Magno¹, D.Lotti², L. Mandrioli¹, L.Zagnoli¹, F.
Bresciani¹, S. Corradini¹, E. Cloriti¹, M. Jöchler¹, F. Cinti¹, F. Fracassi¹.

Veterinaria, 26:25-35, 2012

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Scuola di Agraria e
Medicina Veterinaria, Bologna

²Centro di referenza in neurologia, Neurodiagnostica e Neurochirurgia,
Cambiano, Torino

RIASSUNTO

Un cane Galgo Spagnolo femmina di 8 anni affetto da sindrome di Cushing, trattato inizialmente con trilostano, è stato presentato per l'insorgenza di sintomi neurologici prosencefalici. La risonanza magnetica ha permesso la visualizzazione di un macroadenoma ipofisario di notevoli dimensioni. Il soggetto è stato sottoposto ad un intervento di ipofisectomia transsfenoidale che ha permesso di controllare la sintomatologia neurologica. Il ripresentarsi dei segni clinici e la risonanza magnetica di controllo, eseguita a due mesi dall'intervento, hanno evidenziato la presenza di parte della neoplasia. Il cane è stato pertanto sottoposto ad un secondo intervento di ipofisectomia. Una successiva risonanza magnetica ha permesso di evidenziare l'asportazione in toto della massa con conseguente risoluzione della sintomatologia neurologica e della disendocrinia. Questo case report supporta il fatto che macroadenomi di notevoli dimensioni, che determinano sintomatologia neurologica, possano essere trattati chirurgicamente con successo. In caso di necessità, un secondo intervento chirurgico può risultare fattibile ed efficace.

INTRODUZIONE

La Sindrome di Cushing o ipercortisolismo è caratterizzata dagli aspetti clinici e laboratoristici conseguenti all'esposizione cronica e patologica ad eccessivi livelli ematici di glucocorticoidi¹. Nell'80-85% dei casi l'ipercortisolismo spontaneo è il risultato dell'aumento di secrezione di ormone adrenocorticotropo (ACTH) ad opera di una neoplasia ipofisaria, pertanto si presenta nella forma ipofisi-dipendente (PDH, Pituitary Dependent Hypercortisolism), ne consegue un'iperstimolazione surrenalica con aumento della secrezione di glucocorticoidi. Nella maggior parte degli altri casi la patologia è invece ACTH-indipendente ed è solitamente dovuta a un'ipersecrezione da parte di una neoplasia cortico-surrenalica.

Le lesioni ipofisarie secernenti ACTH possono essere piccoli nidi di cellule corticotrope iperplastiche o neoplasie estese che originano dalla *pars distalis* (PD) o dalla *pars intermedia* (PI) dell'ipofisi¹. Sulla base delle dimensioni, gli adenomi ipofisari vengono classificati come microadenomi o macroadenomi, questi ultimi sono caratterizzati da un aumento delle dimensioni dell'ipofisi. Nonostante in letteratura siano stati proposti dei valori di *cut-off* per differenziare i micro dai macroadenomi, questi non sono universalmente accettati e alcuni autori preferiscono parlare di ipofisi normale o aumentata di dimensioni^{2,3}. Kooistra⁴ ha proposto di suddividerli in micro e macroadenomi sulla base del rapporto fra l'altezza dell'ipofisi e l'area cerebrale (P/B ratio). Queste

misurazioni vanno eseguite in una immagine di tomografia computerizzata (TC) o risonanza magnetica (RM) in sezione trasversale in cui l'ipofisi presenti la massima altezza. Nel caso in cui il P/B ratio risulti al di sotto o al di sopra di 0,31^{4,5} vengono definiti rispettivamente micro e macroadenomi. Circa il 10-20% dei soggetti affetti da PDH presenta macroadenomi di dimensioni tali da determinare segni neurologici, quali alterazione dello stato mentale, atassia, tetraparesi, compulsione, alterazioni del comportamento, nistagmo, cecità, crisi convulsive e coma⁶.

In presenza di un macroadenoma con sintomatologia neurologica, le sole opzioni terapeutiche utili ad eliminare l'effetto compressivo sul sistema nervoso centrale sono il trattamento chirurgico o la radioterapia. L'ipofisectomia transsfenoidale nel cane è una terapia efficace in caso di adenoma ipofisario; tuttavia richiede la disponibilità di un chirurgo esperto e di un centro specializzato. In tale tipo di chirurgia le complicazioni e la mortalità aumentano all'aumentare delle dimensioni della massa neoplastica³. Nel caso di neoplasie estremamente voluminose l'obiettivo della chirurgia è la riduzione dell'effetto massa, grazie alla rimozione di quanto più possibile tessuto tumorale; in tali casi il trattamento chirurgico non è solitamente risolutivo per lo stato di ipercortisolismo e può rendersi necessario l'abbinamento di una terapia medica.

Nel presente lavoro riportiamo il trattamento chirurgico e il follow-up di un cane con PDH e segni neurologici, dovuti ad un macroadenoma ipofisario di notevoli dimensioni.

DESCRIZIONE DEL CASO CLINICO

Un cane femmina di razza Galgo Spagnolo di 8 anni affetto da sindrome di Cushing è stato riferito presso il Centro di Referenza di Neurologia di Cambiano. Cinque mesi prima, sulla base della sintomatologia clinica, di un profilo emato-biochimico, di un'ecografia addominale e di un test di stimolazione con ACTH (cortisolo basale 6,0 µg/dl e post-stimolazione 44,5 µg/dl), era stata effettuata una diagnosi di PDH. Il soggetto era stato sottoposto a terapia con trilostano (Vetoryl®) (2 mg/kg BID OS) e monitorato attraverso controlli clinici e test di stimolazione con ACTH. Il cane aveva inizialmente risposto positivamente alla terapia e ad un controllo effettuato a 3 mesi dalla diagnosi indicava un efficace controllo della patologia (cortisolo basale 0,9 µg/dl e cortisolo post stimolazione con ACTH 3,3 µg/dl), tranne che per il permanere della poliuria e polidipsia, motivo per il quale era stata introdotta la somministrazione di desmopressina (una goccia nel sacco congiuntivale di un occhio BID) con lieve riduzione della sintomatologia.

Il soggetto è stato riferito poiché da circa un mese aveva iniziato a manifestare movimenti compulsivi depressione del sensorio, ansietà prevalentemente notturna, episodi di

disorientamento e calo del visus. Alla visita clinica si rilevava uno stato di nutrizione scadente, pelo opaco e rarefatto, con aree alopeciche che interessavano tronco e coda (Fig. 1).



FIGURA 1 - Cane femmina di 6 anni, Galgo spagnolo affetto da Sindrome di Cushing. Stato di nutrizione scadente, atrofia muscolare, pelo opaco e rarefatto con aree alopeciche che interessavano tronco, arti e coda.

All'esame neurologico le alterazioni presenti consistevano in ritardo di risposta al gesto di minaccia e ritardo del riflesso pupillare diretto e consensuale bilaterale con pupille di dimensioni normali. All'auscultazione cardiaca si percepiva un soffio sistolico (III/VI grado) con massima intensità a sinistra in corrispondenza della punta del cuore.

Sulla base dei dati anamnestici, clinici e della visita neurologica è stato possibile localizzare la lesione a livello prosencefalico, presupponendo un interessamento specifico delle strutture del diencefalo ventrale adiacenti al chiasma ottico, in virtù del ritardato riflesso pupillare e della diminuzione della capacità visiva. Le principali diagnosi differenziali includevano un macroadenoma ipofisario, altre neoplasie intracraniche o, causa meno probabile, encefalite. Gli esami emato-biochimici non mettevano in evidenza alterazioni significative tranne linfopenia (550/mm³ range 1000-4800/mm³), un lieve incremento dell'alanina-aminotransferasi (ALT) (78 U/L range 20-55 U/L) e della gamma glutamil-transferasi (GGT) (11.0 U/L range 0-5,8 U/L). Sono stati riscontrati ridotti livelli di tiroxina libera (fT₄) pari a 8,9 pmol/L (16,0-31,8 pmol/L) associati a normoconcentrazione di ormone tireostimolante (TSH) (0,16 ng/ml range 0,03-0,40 ng/ml). La Risonanza Magnetica (RM) del cranio è stata condotta con magnete Vet-RM Esaote 0,2 Tesla, con sequenze SE pesate in T1 (TR 550, TE 18) e T2 (TR 4080, TE 80), Flair

(TR 400,TE 90), pesate in SET1 sagittali, TSE T2 trasverse, e completata dopo la somministrazione endovenosa di contrasto paramagnetico (0,1 mmol/kg, Gadovist®, Bayer) con sequenze eseguite nei tre piani dello spazio e con sequenze Flair nel piano dorsale. L'esame ha messo in evidenza nella regione intra e soprasellare la presenza di una voluminosa lesione espansiva che si estendeva verso il talamo, prevalentemente di sinistra (Fig. 2A, 2B), di forma irregolarmente ovalare, a margini regolari e di dimensioni approssimative di 16,33 mm in senso dorso-ventrale, 23 mm in quello latero-laterale e 21 mm in quello oro-aborale. La massa presentava segnale disomogeneamente iso/iperintenso nelle sequenze pesate in SET1, SET2 e Flair e assumeva contrasto in modo omogeneo. Il P/B ratio era di 1,28. Le immagini erano compatibili in prima istanza con un macroadenoma dell'ipofisi, nonostante non potesse essere comunque escluso un meningioma della sella turcica per la lieve asimmetria di crescita della massa. La diagnosi clinica e di laboratorio di sindrome di Cushing, associata alle immagini osservate in RM, hanno consentito di formulare la diagnosi definitiva di macroadenoma ipofisario.

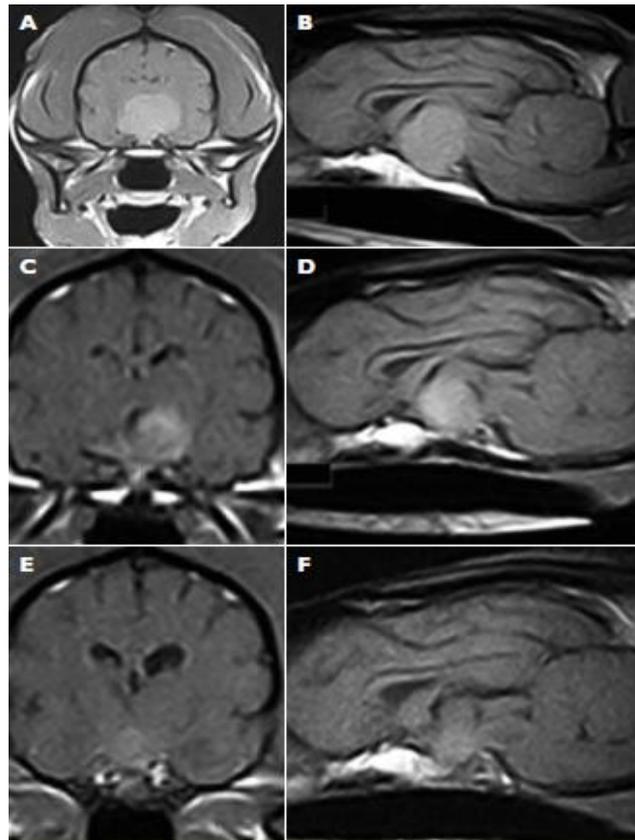


FIGURA 2

2A) Primo esame RM, sezione trasversa SET1 effettuata con dose piena di contrasto: massa che si erge a palizzata verso il talamo, di forma ovalare, che ha assunto contrasto e di dimensioni in senso latero-laterale approssimativamente di 23 mm.

2B) Primo esame RM, sezione sagittale SET1 effettuata dopo dose piena di contrasto: massa a partenza dalla sella turcica di forma ovalare che ha assunto *enhancement* omogeneo, di dimensioni approssimative di 16,33 mm in senso dorso-ventrale e 21 mm in quello oro-aborale.

- 2C) Secondo esame RM, sezione trasversa SET1 dopo somministrazione di mezzo di contrasto, la massa è decisamente meno voluminosa, soprattutto nella sua porzione sinistra (da 12,62 mm a 8,16 mm).
2D) Secondo esame RM, sezione sagittale SET1 dopo somministrazione di mezzo di contrasto. Si evidenzia una netta riduzione di volume della massa.
2E) Terzo esame RM, sezione trasversa SET1 dopo somministrazione di mezzo di contrasto.
2F) Terzo esame RM, sezione sagittale dopo somministrazione di mezzo di contrasto: la massa assume scarsamente *enhancement* ed è di dimensioni decisamente ridotte rispetto al primo e al secondo esame RM.

La terapia proposta è stata la radioterapia o la rimozione chirurgica della massa neoplastica e il proprietario ha deciso di sottoporre il cane alla nostra valutazione presso l'Ospedale Didattico del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna per l'esecuzione dell'ipofisectomia transsfenoidale. In previsione della chirurgia la terapia con trilostano è stata sospesa 3 giorni prima dell'intervento, mentre la desmopressina è stata somministrata fino alla mattina dell'intervento. Il protocollo anestesilogico è consistito in una premedicazione con midazolam (0,2 mg/kg EV), con un successivo bolo carico di fentanyl citrato (0,002 mg/kg EV), al quale è seguita l'infusione dello stesso agente analgesico a dosaggi variabili (da 0,003 a 0,008 mg/kg/h EV) per tutta la durata della procedura anestesilogica. L'induzione è stata effettuata con propofol (2 mg/kg EV) e il mantenimento condotto con propofol in infusione (da 0,2 a 0,4 mg/kg/h EV) in ventilazione assistita a pressione positiva intermittente (IPPV) con isofluorano (da 0,8 a 1,2%) in ossigeno puro⁷. All'induzione è stata somministrata ampicillina e sulbactam (20 mg/kg EV). Sono stati monitorati la pulsiossimetria, la capnografia, l'elettrocardiogramma, la pressione arteriosa invasiva, la temperatura rettale e l'output urinario previo posizionamento di un catetere urinario tipo Foley. Inoltre, subito dopo l'induzione, è stato posizionato un catetere venoso centrale per misurare la pressione venosa centrale e poter eseguire agevolmente i prelievi ematici. Durante l'anestesia è stata una soluzione di NaCl allo 0,45% e glucosata al 2,5% (10 ml/kg/h), supplementata con 10 mEq di KCl/500 ml⁸. Durante il periodo chirurgico sono stati effettuati dei prelievi seriali per il monitoraggio della glicemia e degli elettroliti⁸, al fine di rilevare possibili alterazioni (ad esempio ipoglicemia, ipernatremia). L'ipofisectomia è stata eseguita mediante un approccio transorale e transsfenoidale seguendo la tecnica descritta da Meij⁹.

L'animale è stato posizionato in decubito sternale con la testa sollevata rispetto al corpo per facilitare il deflusso di sangue dalle vene giugulari ed evitare la congestione venosa, garantendo una normale perfusione cerebrale. Il collo è stato sostenuto mediante sostegni morbidi al fine di evitare le possibili tensioni sui muscoli cervicali. Per ottenere una visione ampia del campo operatorio, la mascella è stata fissata tramite i denti canini ad una barra orizzontale di sostegno, mentre la mandibola è stata retratta ventralmente il più possibile con una benda orlata ancorata al tavolo operatorio. È stato poi utilizzato del cerotto per migliorare l'immobilità del cranio⁹.

Prima della disinfezione del cavo orale mediante iodio povidone al 10% è stata posizionata una garza nell'orofaringe per evitare complicazioni dovute all'aspirazione della soluzione disinfettante e successivamente di sangue. L'incisione del palato molle a tutto spessore è stata eseguita tramite elettrobisturi monopolare; una volta raggiunto il rinofaringe è stato applicato un retrattore autostatico di Gelpi e sono state posizionate delle suture di ancoraggio per divaricare ulteriormente i lembi del palato molle, permettendo una ampia visione del mucoperiostio sfenoidale. A questo punto è stato necessario riferirsi alla diagnostica per immagini avanzata per individuare i punti di repere per l'esecuzione dell'accesso allo sfenoide mediante fresa pneumatica. La RM non permetteva tuttavia di individuare con certezza i landmark ossei costituiti dall'apice dei processi amulari dell'osso pterigoideo e dalla presenza di un rilievo/solco nella porzione mediana dell'osso sfenoidale^{5,9}. Si è deciso quindi di procedere secondo l'esperienza acquisita dal chirurgo, cioè si è iniziato a fresare in posizione mediana tra i processi amulari, nella loro porzione più caudale e in corrispondenza di un sospetto residuo embrionale dell'arteria emissaria^{10,11}. Raggiunto l'endostio si è proceduto alla rimozione di quest'ultimo con l'utilizzo di cucchiari di Volkmann e ossivore Kerrison permettendo la visualizzazione della dura madre. Questa apertura non ha permesso di evidenziare la sella turcica, ma si è rivelata essere leggermente caudale, in corrispondenza dei corpi mammillari e/o della fossa interpeduncolare. È stata così eseguita una seconda apertura più craniale (0,5 x 1 cm) in corrispondenza della sella turcica. Da questo varco la dura madre, ancora presente, lasciava trasparire un tessuto di colorito rosato, disomogeneo al centro, con ai lati due strutture vascolari di colorazione bluastra, compatibili con i seni cavernosi, che decorrono lateralmente alla ghiandola. La meninge è stata incisa mediante lama da bisturi n. 11 e successivamente l'apertura è stata ampliata mediante l'uso di un uncino. In seguito all'incisione della meninge si è avuta la fuoriuscita del liquido cefalorachidiano in sincronia con gli atti respiratori. L'estensione della neoformazione è stata sondata con un uncino atraumatico. L'asportazione della massa è stata praticata per frammentazione della stessa, mediante pinze da ipofisi ed una curette auricolare atraumatica supportata da una contemporanea blanda aspirazione fino alla visualizzazione della base dell'ipotalamo e del recesso del terzo ventricolo (Fig. 3). Un'ulteriore ed ultima pulizia della cavità è stata praticata mediante l'utilizzo di una spugna di cellulosa emostatica, facendola ruotare all'interno della cavità stessa. Infine, per riempire la cavità che residuava dopo l'asportazione della neoformazione, è stata posizionata nel difetto una porzione di spugna emostatica. Le aperture eseguite nell'osso sfenoidale sono state chiuse con cera per ossa e il mucoperiostio ricostruito interamente mediante una sutura continua, utilizzando Polysorb® 3-0. Il palato molle è stato suturato sempre con Polysorb® 3-0, con una sutura

continua per la mucosa del rinofaringe e punti nodosi staccati per la mucosa dell'orofaringe⁹.

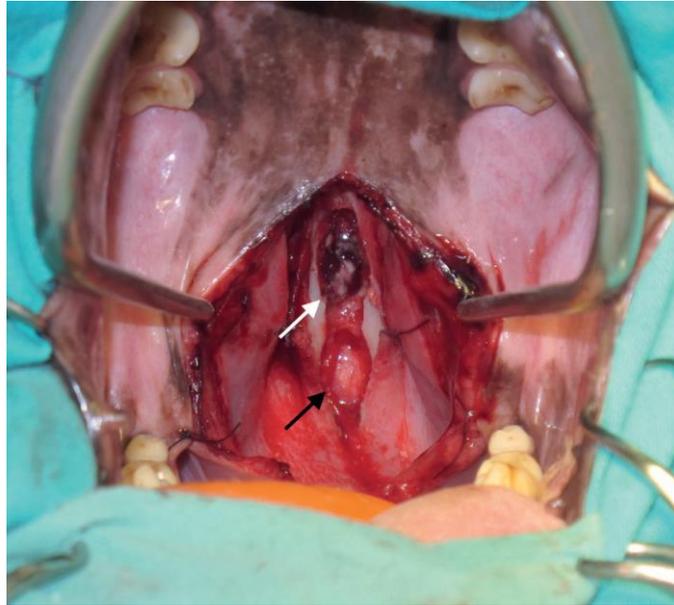


FIGURA 3 - Foto intraoperatoria, primo intervento chirurgico. Dall'apertura più dorsale dell'osso sfenoidale, in corrispondenza della sella turcica, dopo l'incisione della dura madre è possibile visualizzare il materiale neoplastico di colore rosatorosso scuro disomogeneo (freccia bianca). L'apertura più ventrale (freccia nera) corrisponde al primo accesso all'osso sfenoidale troppo caudale.

Il protocollo terapeutico impostato nell'immediato post-operatorio ha previsto la somministrazione di ampicillina e sulbactam (20 mg/kg TID EV), fentanil CRI (0,002 mg/kg/h) per le prime dodici ore, sostituito il giorno seguente con metadone (0,2 mg/kg ogni 4-6 ore a seconda della necessità). Sono stati inoltre somministrati desmopressina (1 goccia nel sacco congiuntivale BID) e levotiroxina (20 mcg/kg SID). La fluidoterapia è stata continuata sulla base del monitoraggio emogasanalitico e pressorio del paziente. La somministrazione di glucocorticoidi, metilprednisolone succinato (1mg/kg BID EV), è iniziata la mattina seguente all'intervento. Al momento del risveglio dall'anestesia il cane ha mostrato agitazione, esoftalmo e tumefazione dei muscoli masseteri e temporali, nonché ipertensione arteriosa. È stata pertanto incrementata l'analgesia e somministrato midazolam CRI (0,06 mg/kg/h EV), mannitolo (1g/kg EV in 20 minuti) e furosemide (1 mg/kg EV). Apparentemente, solo la furosemide ha determinato un beneficio nel controllo pressorio. Nei tre giorni seguenti i fenomeni ipertensivi si sono susseguiti, soprattutto durante le ore serali (l'intensità e la durata non sono stati tali da richiedere una terapia), mentre l'esoftalmo e la tumefazione dei muscoli masticatori è scomparsa il giorno successivo all'intervento. Il secondo giorno post-operatorio il cane ha ripreso a

deambulare, continuando a mostrare compulsione e maneggio sinistro; ha ripreso ad alimentarsi spontaneamente e al quarto giorno post-operatorio è stata interrotta la fluidoterapia. Il secondo giorno dopo l'intervento è stato eseguito uno Schirmer Tear Test per valutare la produzione lacrimale, che è risultata essere nella norma.

Il cane è stato dimesso in sesta giornata con terapia costituita da amoxicillina e acido clavulanico (20 mg/kg BID per OS per 15 giorni), tramadolo (3 mg/kg BID per OS per 5 giorni), prednisone (0,5 mg/kg BID per OS per la prima settimana, per poi scalare nella seconda settimana a 0,25 mg/kg BID e 0,25 mg/kg SID dalla quarta settimana), levotiroxina (20 mcg/kg SID) e desmopressina (1 goccia nel sacco congiuntivale di un occhio BID per due settimane). La sintomatologia neurologica è cessata circa quindici giorni dopo l'intervento; il cane è tornato ad essere interattivo con i proprietari e con gli altri cani. I campioni intraoperatori di tessuto ipofisario sono stati fissati immediatamente in formalina tamponata al 10% e processati per ottenere sezioni istologiche di 5 µm colorate con Ematossilina-Eosina. I frammenti tissutali esaminati comprendevano cellule neoplastiche organizzate in nidi, isole, trabecole tra le quali si riscontravano alcuni follicoli contenenti materiale eosinofilo amorfo (colloide) (Fig. 4). Le cellule neoplastiche mostravano due fenotipi: alcune erano di dimensioni piuttosto piccole e possedevano un citoplasma basofilo che oscurava i dettagli nucleari, mentre le altre, più grandi e con limiti citoplasmatici definiti, contenevano una moderata quantità di citoplasma cromofobo; i nuclei ipocromatici erano tondeggianti, spesso vescicolosi e contenevano due-tre nucleoli. In alcuni campi erano presenti alcuni macronuclei. Anisocitosi e anisocariosi erano moderate. Le figure mitotiche erano meno di una per 10 campi a forte ingrandimento (obiettivo 40x). Lo stroma intratumorale era riccamente vascolarizzato da parte di strutture che davano origine sia a spazi lacunari che capillari. La diagnosi istologica è stata di adenoma della pars intermedia dell'ipofisi.

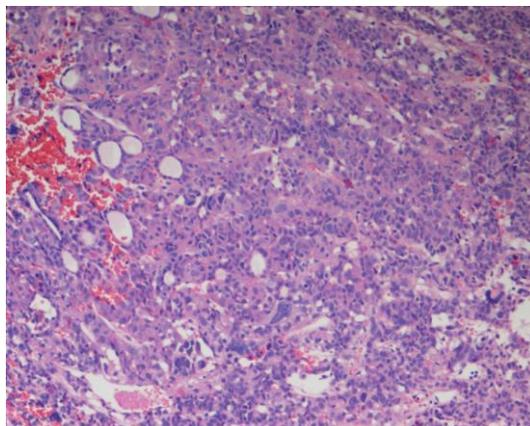


FIGURA 4 - Microscopia ottica della massa rimossa, ingrandimento 10x, colorazione con ematossilina-eosina. Le cellule neoplastiche sono organizzate in isole e trabecole tra le quali si riscontrano alcuni follicoli

contenenti raro materiale eosinofilo amorfo riferibile a colloide. Le cellule neoplastiche mostrano limiti citoplasmatici definiti, contengono una moderata quantità di citoplasma; i nuclei ipocromatici sono tondeggianti, spesso vescicolosi e contengono due o tre nucleoli; in alcuni campi sono presenti alcuni macronuclei. Anisocitosi e anisocariosi sono moderate. Tali aspetti sono compatibili con adenoma della pars distalis

A due mesi dall'intervento chirurgico il cane era in buone condizioni cliniche, non mostrava poliuria e polidipsia, tuttavia la cute permaneva alopecica ed assottigliata. Alla visita neurologica il cane non mostrava alcun deficit. Nei due mesi successivi tuttavia la condizione neurologica è progressivamente peggiorata, con comparsa di depressione del sensorio sempre più grave e stato di apatia. È stata eseguita una RM di controllo che ha consentito di rilevare, rispetto allo studio precedente, una massa meno sviluppata in senso dorsale, totalmente asportata nella sua porzione destra, e decisamente meno voluminosa nella sua porzione sinistra (da mm 12,62 a mm 8,16) (Fig. 2C, 2D). Si è pertanto deciso di sospendere la terapia di supplementazione con prednisone, vista la presenza di una porzione della massa.

Alla sospensione dei corticosteroidi il cane non ha mostrato alcun segno di ipocortisolismo. A fronte di questa RM si è deciso di sottoporre il soggetto ad un nuovo intervento chirurgico per asportare il tessuto neoplastico residuo. I protocolli anestesiologico e chirurgico sono stati i medesimi del primo intervento, con l'eccezione dell'apertura dello sfenoide, che era già presente semplicemente rimuovendo la cera per ossa ancora in situ. Una volta raggiunta la sella turcica, è stato asportato abbondante materiale fino a quando la superficie ventrale dell'ipotalamo è risultata chiaramente visibile. La chiusura del sito chirurgico ha ripercorso i passaggi già descritti nel primo intervento, tuttavia non è stato possibile suturare completamente il mucoperiostio. Nel periodo post-operatorio i problemi riscontrati sono stati ipertermia, che si accentuava in seguito a deambulazione (temperatura fino a 40,5°C), e ipernatremia. Visto il rialzo termico è stata aggiunta marbofloxacina (2 mg/kg IV SID) la quale non ha sortito effetto. L'ipertermia si è risolta dopo 5 giorni. Le terapie mediche di supplementazione e post-operatorie sono rimaste invariate rispetto al primo intervento con la sola differenza che la fluidoterapia con NaCl 0,45% e glucosata 2,5% è stata mantenuta per circa 10 giorni; inoltre la somministrazione di desmopressina è stata incrementata da 1 goccia BID a 1 goccia TID dopo il secondo intervento chirurgico. Nel decorso post-operatorio la condizione neurologica è peggiorata con manifestazioni di maneggio destro e compulsione. Tale sintomatologia è regredita spontaneamente nell'arco di circa dieci giorni. Il paziente è stato dimesso al decimo giorno postoperatorio con terapia antibiotica, amoxicillina e acido clavulanico (20 mg/kg BID per OS per 7 giorni), cortisone acetato (0,25 mg/kg BID da scalare dopo due settimane a 0,25 mg/kg SID),

tiroxina (15 mcg/kg BID) e desmopressina (1 goccia nel sacco congiuntivale di un occhio TID). La desmopressina è stata sospesa una settimana dopo la dimissione, tuttavia, visto il ripresentarsi di poliuria e polidipsia, si è deciso di reintrodurre tale terapia. La diagnosi istologica sui frammenti tissutali asportati ricalcava la precedente, era inoltre presente del tessuto post-emorragico in organizzazione. La ripresa clinica del soggetto dopo il secondo intervento è stata sensibilmente più lenta. I segni neurologici sono regrediti pressoché completamente; tuttavia, per circa due mesi, il soggetto ha continuato a manifestare riluttanza al movimento, astenia e rigidità agli arti posteriori.

Sono stati eseguiti esami emato-biochimici dopo 20 giorni dal secondo intervento, per valutare lo stato generale del paziente, sono inoltre stati misurati gli elettroliti e gli ormoni tiroidei, risultanti nella norma, ad eccezione per il T4 che è risultato lievemente basso (13,9 pmol/L, range 15,1-42,3).

La seconda RM di controllo, effettuata a 60 giorni dal secondo intervento, ha mostrato nella regione soprasellare una piccola area irregolarmente sferoidale dalle dimensioni di 5,9 mm di larghezza, 5,2 mm di altezza e 6,2 mm di lunghezza. La lesione evidenziata era isointensa nelle sequenze pesate T1 e lievemente iperintensa in quelle pesate in T2 e assumeva lieve enhancement dopo somministrazione di mezzo di contrasto. Non era presente effetto massa sulle strutture encefaliche mediane, né era apprezzabile edema perilesionale. L'esame ha permesso di rilevare ampliamento dei solchi e dei ventricoli laterali (Fig. 2E, 2F). A 7 mesi dal primo intervento e 3 mesi dal secondo intervento il cane è in buone condizioni generali e le uniche alterazioni sono una lieve atassia e riluttanza a correre. Le alterazioni dermatologiche sono regredite pressoché completamente e anche la poliuria-polidipsia risultava adeguatamente controllata. Gli esami emato-biochimici sono rientrati nella norma ad eccezione di lievi alterazione di ALT (151, range 22-78 U/L) e GGT (17,6, range 1,2-10,9 U/L).

DISCUSSIONE

Varie sono le modalità di classificazione degli adenomi ipofisari in base alle loro dimensioni. Nel presente lavoro si è deciso di utilizzare la metodica proposta da Kooistra⁴ poiché valutando il rapporto tra l'altezza dell'ipofisi e l'area cerebrale è possibile minimizzare l'influenza data dal tipo di cranio e dalla taglia dell'animale. Nel paziente di questo report il P/B ratio era di 1,2⁸ e pertanto si trattava di un macroadenoma (P/B normale <0,31)⁵. Gli adenomi ipofisari ACTH secernenti possono insorgere dalla pars distalis o dalla pars intermedia dell'adenoipofisi. Le cellule della PI, a differenza di quelle della PD, non presentano recettori per il cortisolo¹², non risentendo pertanto dell'effetto

inibitorio di quest'ormone. Questo mancato feed-back potrebbe influenzare le dimensioni di tali neoplasie, si è pertanto supposto che gli adenomi della PI tendano ad aumentare maggiormente di volume rispetto agli adenomi della PD¹³. Nel presente caso l'esame istologico della neoformazione asportata ha evidenziato caratteristiche tissutali compatibili con adenoma originante dalla pars intermedia; ciò potrebbe dunque spiegare le notevoli dimensioni del tumore.

La TC risulta essere la metodica di diagnostica per immagini avanzata d'elezione nei soggetti da sottoporre ad ipofisectomia^{5,9}. Tale metodica permette infatti di evidenziare con chiarezza l'anatomia ossea del soggetto e di conseguenza i punti di reperi per accedere alla sella turcica^{5,9}. Nel soggetto in questione, considerando la rilevante sintomatologia neurologica, per formulare la diagnosi è stata scelta la RM e per motivi economici non è stato possibile effettuare anche l'esame TC prima dell'intervento. Tuttavia l'indagine eseguita ha permesso di visualizzare al meglio la massa e le strutture adiacenti, anche se non ha consentito una adeguata valutazione dei punti di reperi chirurgici.

Inoltre non è stato possibile stabilire prima della chirurgia lo spessore dell'osso sfenoidale, poiché la RM non forniva dettagli ossei adeguati. Un elevato spessore dell'osso sfenoidale è stato correlato ad una maggiore difficoltà nell'asportazione completa della neoplasia ed a un più alto tasso di recidiva³. Nel nostro caso l'osso non si presentava particolarmente spesso in sede intraoperatoria. Queste difficoltà, unitamente alla conformazione dolicocefalica del cane ed alla presenza di un probabile residuo vascolare embrionale a livello della faccia esocranica dello sfenoide, hanno contribuito ad un primo errato accesso chirurgico, risultato essere troppo caudale. Ciò non ha comunque inficiato l'esecuzione della chirurgia, tuttavia sottolinea l'importanza della complementarità della RM e della TC per poter pianificare ed eseguire al meglio l'intervento. Considerata la marcata sintomatologia neurologica, causata dalla compressione che il macroadenoma esercitava sull'ipotalamo, l'approccio chirurgico era l'unico che permettesse di ottenere una diminuzione dell'effetto massa in breve tempo. La radioterapia avrebbe potuto costituire una valida alternativa terapeutica^{14,15}, anche se in letteratura esistono dati discordanti relativamente alla sua efficacia nel trattamento di pazienti con grave sintomatologia neurologica¹⁶. In medicina umana la terapia d'elezione nel caso di adenomi ipofisari è la rimozione chirurgica selettiva della porzione neoplastica della ghiandola¹⁷. Al contrario nel cane, per avere la sicurezza di asportare completamente il tumore, è necessario rimuovere l'ipofisi in toto¹⁸. In entrambi gli interventi chirurgici non si sono verificate complicazioni intraoperatorie, quali ad esempio emorragie. Tale evenienza è stata descritta ed è uno degli inconvenienti intraoperatori di più difficile gestione⁸, soprattutto nel caso in cui venga lacerata la parete delle arterie carotidi interne, le quali decorrono

all'interno dei seni cavernosi lateralmente all'ipofisi. Le complicazioni post-operatorie conseguenti al primo intervento chirurgico, rappresentate da esoftalmo e tumefazione dei muscoli masticatori, sono già state segnalate da Meij⁸ e sembrano essere dovute al posizionamento a cui l'animale viene forzato durante l'intervento. Per ovviare a tale problema gli autori sopra citati suggeriscono il rilascio temporaneo della mandibola in posizione quasi fisiologica ogni trenta minuti durante l'intervento, oppure la riduzione del grado di apertura della bocca⁸. Nel secondo intervento il cane è stato posizionato con una minore apertura della cavità orale e non si sono ripresentate tali complicazioni.

I fenomeni ipertensivi che si sono verificati nel primo periodo post-operatorio potevano essere causati dall'insufficiente analgesia o da un aumento della pressione intracranica conseguente all'intervento. Queste due ipotesi sono risultate tuttavia poco attendibili poiché tale complicanza non ha risposto né ad un incremento dell'analgesia né alla somministrazione di mannitolo, inoltre il paziente manteneva una frequenza cardiaca nella norma (70-100 battiti/minuto). Tale ipertensione non appariva correlata né con la somministrazione di desmopressina né con alterazioni della natremia. Rimane pertanto un dubbio interpretativo su tale complicazione. L'ipernatremia, riportata frequentemente in letteratura nell'immediato periodo post-operatorio^{2,8,9}, non si è verificata in seguito al primo intervento chirurgico, mentre era presente ed è risultata di difficile controllo dopo il secondo intervento.

Nei soggetti sottoposti ad ipofisectomia si verifica solitamente un deficit transitorio di liberazione di vasopressina, conseguente all'asportazione della neuroipofisi (serbatoio di vasopressina e ossitocina). Per evitare o limitare l'incremento ematico di sodio durante la chirurgia e nel periodo post-operatorio vengono somministrati fluidi poveri di sodio (NaCl 0,45% + glucosata 2,5%), nonché desmopressina subito dopo il risveglio dall'anestesia. Uno studio di Hara¹⁹ dimostra infatti che la somministrazione di desmopressina al termine dell'intervento chirurgico previene l'ipernatremia in soggetti sani ipofisectomizzati. Nei cani affetti da sindrome di Cushing sottoposti ad ipofisectomia è possibile che l'ipernatremia si sviluppi nelle prime ore e giorni post-operatori, nonostante la somministrazione di desmopressina, probabilmente per una resistenza cortisolo-indotta². L'assenza di squilibrio della natremia conseguente al primo intervento era probabilmente correlata ad una parziale asportazione della massa, senza che venisse danneggiata o asportata in toto la neuroipofisi. Il secondo intervento chirurgico è risultato più radicale e pertanto è probabile che in tale occasione la neuroipofisi sia stata asportata completamente. In seguito all'ipofisectomia, in corso di microadenomi, si verifica un diabete insipido transitorio, che solitamente regredisce nell'arco di qualche settimana²⁰. Nel caso di neoplasie di notevoli dimensioni, la compressione esercitata sull'ipotalamo

può determinare dei danni permanenti ai nuclei sopraottico e paraventricolare (produttori di vasopressina), con conseguente diabete insipido permanente². Tale evenienza sembra essersi verificata nel soggetto del presente articolo, poiché la sospensione della desmopressina, dopo due settimane dal secondo intervento chirurgico, ha determinato la ricomparsa di poliuria e polidipsia. L'ipertermia, manifestatasi dopo il secondo intervento, è stata probabilmente causata da una lesione parziale e transitoria dei nuclei ipotalamici termoregolatori durante la rimozione delle porzioni più dorsali della neoplasia. Anche la sintomatologia neurologica, manifestatasi dopo la seconda chirurgia, potrebbe essere stata conseguente alla diretta manipolazione chirurgica delle strutture encefaliche o alla formazione di edema secondario alla manipolazione stessa. La somministrazione di mannitolo e un dosaggio maggiore di corticosteroidi avrebbero potuto potenzialmente alleviare tale sintomatologia, non sono stati tuttavia utilizzati per il difficile controllo della natremia e della poliuria. È improbabile che un'infezione potesse rappresentare la causa dell'ipertermia, sia perché quest'ultima si è verificata immediatamente dopo l'intervento, sia perché il soggetto era sottoposto a terapia antibiotica ad ampio spettro. In seguito all'ipofisectomia non sono mai stati riportati, nel cane, fenomeni di infezione locale o meningiti, nonostante non venga attuata alcuna misura di disinfezione nel rinofaringe.

Vengono però somministrati antibiotici ad ampio spettro per 10-15 giorni nel periodo post-operatorio^{2,8,21}. In letteratura viene riportata una riduzione della secrezione lacrimale, più frequentemente a carico dell'occhio sinistro, in seguito all'intervento chirurgico⁸. Per tale motivo è stato eseguito lo Schirmer Tear Test volto alla valutazione quantitativa della produzione lacrimale. La causa della riduzione della produzione lacrimale non è ancora stata chiarita. Sarebbe interessante poter valutare attraverso studi prospettici se un approccio radioterapico post-chirurgico possa influenzare il decorso della malattia e i tempi di sopravvivenza. Nell'uomo l'utilizzo di una terapia radiante è prevista in seguito a persistenza o recidiva di un adenoma ipofisario ACTH-secrente, con lo scopo di diminuirne la secrezione ormonale, ridurre il rischio di recidiva e possibilmente diminuire le dimensioni del tumore. Le complicazioni possibili sono necrosi dei tessuti circostanti a quelli irradiati, panipopituitarismo, vasculopatie a carico del tessuto cerebrale e neoplasie correlate all'irradiazione. È inoltre necessario un certo periodo di tempo perché gli effetti della radioterapia determinino un effetto evidente sul tessuto neoplastico rimasto in situ²². In letteratura viene indicato che maggiori sono le dimensioni dell'adenoma ipofisario e maggiore è lo spessore dell'osso sfenoidale, maggiori sono le difficoltà di ablazione completa della massa e maggiori sono le probabilità di recidiva³. Lo scopo principale dell'ipofisectomia in caso di macroadenomi di notevoli

dimensioni è il miglioramento della sintomatologia neurologica, mentre non è sempre possibile raggiungere la completa guarigione per quanto riguarda l'ipercortisolismo. In tali casi è pertanto necessario continuare/intraprendere la terapia medica. In letteratura scarsi sono i dati relativi alla prosecuzione dell'iter terapeutico in caso di recidiva della sintomatologia neurologica in seguito ad un primo intervento chirurgico.

In Medicina Umana l'opzione di eseguire un secondo intervento chirurgico, in caso di persistenza/ recidiva dell'adenoma, determina la remissione della patologia nel 70% dei casi²². Il reintervento è inoltre considerato relativamente sicuro e la più comune complicazione è rappresentata dal panipopituitarismo²². Pur avendo proposto un protocollo radioterapico, nel presente caso, al ripresentarsi della sintomatologia disendocrina e neurologica, si è optato per una seconda chirurgia, che ha avuto un buon esito. Non sono state inoltre osservate complicazioni correlate ad eventuali modificazioni anatomiche conseguenti alla prima chirurgia. All'ultima RM di controllo (Fig. 2E, 2F) si osservava una notevole riduzione delle dimensioni della neoformazione e la lesione visibile poteva essere compatibile semplicemente con l'esito cicatriziale dell'intervento chirurgico.

Il presente lavoro evidenzia come l'intervento d'ipofisectomia possa risultare una tecnica adeguata in soggetti con sintomatologia neurologica causata da macroadenomi ipofisari di notevoli dimensioni. Inoltre possiamo affermare che nel caso di asportazione incompleta della massa un secondo intervento chirurgico possa rappresentare un'opzione possibile ed efficace.

Bibliografia

1. Galac S., Reusch C.E., Kooistra H.S., Rijnberk A. In: Clinical Endocrinology of Dogs and Cats, An Illustrated Text. Eds Rijnberk A.D., Kooistra H.S. Schluetersche, Hannover, 2010, pp 93-154.
2. Hanson J.M., van't Hoofd M.M., Voorhout G., Teske A., et al: Efficacy of transsphenoidal hypophysectomy in treatment of dogs with pituitary- dependent hyperadrenocorticism. J Vet Intern Med; 19: 687-694, 2005.

3. Hanson J.M., Teske E., Voorhout G., Galac S., et al: Prognostic factors for outcome after transsphenoidal hypophysectomy in dogs with pituitary- dependent hyperadrenocortism. *J Neurosurg*; 107: 830-840, 2007.
4. Kooistra H.S., Voorhout G., Mol J.A., Rijnberk A.: Correlation between impairment of glucocorticoid feedback and the size of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Endocrinol*; 152: 387-394, 1997.
5. Auriemma E., Barthez P.Y., van der Vlugt-Meijer R.H., Voorhout G., et al: Computed tomography and low-field magnetic imaging of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 11 cases (2001-2003). *J Am Vet Med Assoc*; 235: 409-414, 2009.
6. Feldman E.C., Nelson R.W.: Disorders of growth hormone. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Eds Feldman E.C., Nelson R.W., Saunders, St. Louis, Missouri, 2004, pp 45-84.
7. Leece E: Neurological Disease. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Anesthesia and Analgesia*, 2nd edn. Eds Seymour C., Duke-Novarski T., Lookers, Upton, Dorset, 2007, pp 284-295.
8. Meij B.P., Voorhout G., van den Ingh T.S.G.A.M., Bever M.M., et al: Results of transsphenoidal hypophysectomy in 52 dogs with pituitarydependent hyperadrenocorticism. *Vet Surg*; 27: 246-261, 1998.
9. Meij B.P., Voorhout G., van den Ingh T.S.G.A.M., Hazewinkel H.A.W., et al: Transsphenoidal hypophysectomy in beagle dogs: evaluation of a microsurgical technique. *Vet Surg*; 26: 295-309, 1997.
10. Niebauer G.W., Evans S.M.: Transsphenoidal hypophysectomy in the dog. A new technique. *Vet Surg*; 17: 296-303, 1988.
11. Niebauer G.W.: Hypophysectomy. In *Textbook of small animal surgery* 3rd edn. Ed Slatter D., Saunders, Philadelphia, 2003, pp 1677-1694.
12. Antakly T., Sasaki A., Liotta A.S., Palkovis M., et al: Induced expression of glucocorticoid receptor in the rat intermediate pituitary lobe. *Sci*; 229: 277-279, 1985.
13. Bosje J.T., Rijnberk A., Mol J.A., Voorhout G., et al: Plasma concentrations of ACTH precursors correlate with pituitary size and resistance to the dexamethasone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Dome Anim Endocrinol*; 22: 201-210, 2002.
14. Kent M.S., Bommarito D., Feldman E., Theon A.P., et al: Survival, neurologic respons, and prognostic factors in dogs with pituitary masses treated with radiation therapy and untreated dogs. *J Vet Intern Med*; 21: 1027-1033, 2007.

15. de Fournel P., Delisle F., Devauchele P., Rosemberg D.: Effects of radiotherapy on pituitary corticotroph macrotumors in dogs: a retrospective study of 12 cases. *Can Vet J*; 48: 481-486, 2007.
16. Theon A.P., Feldman E.C.: Megavoltage irradiation of pituitary macrotumors in dogs with neurological signs. *J Am Vet Med Assoc*; 213: 225-231, 1998.
17. Biller B.M., Grossman A.B., Stewart P.M., Melmed S., et al.: Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*; 93: 2454-2462, 2008.
18. Voorhout G., Meij P.B., van den Ingh T.S.G.A.M., van der Vlugt-Meijer R.H., et al.: Dynamic computed tomography of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. In *Department of Clinical Companion Animals, Faculty of Veterinary Medicine. Utrecht: Utrecht University*, pp 205-222, 1997.
19. Hara Y., Masuda H., Taoda T., Hasegawa D., et al.: Prophylactic Efficacy of Desmopressin Acetate for Diabetes Insipidus after Hypophysectomy in the Dog. *J Vet Med Sci* 65:17-22, 2003.
20. Meij B.P., Mol J.A., van den Ingh T.S.G.A.M., Bevers M.M., et al: Assessment of pituitary function after transsphenoidal hypophysectomy. *Domest Anim Endocrinol*; 14: 81-97, 1997.
21. Meij B.P.: Hypophysectomy in dogs: a review. *Vet Q*; 21: 134-141, 1999.
22. Liu J.K., Fleseriu M., Delashow J.B., Ciric I.S., et al.: Treatment option for Cushing disease after unsuccessful transphenoidal surgery. *Neurosurg Focus*; 23: 1-7, 2007.

Capitolo 8

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

La diagnosi di SC deve includere valutazioni anamnestiche, dei sintomi clinici, esami ematobiochimici di base ed i test endocrini. Eseguire un protocollo diagnostico completo in soggetti con sintomatologia ed aspetti clinici caratteristici aumenta notevolmente la sensibilità e specificità dei test endocrini. Sia in medicina umana sia in veterinaria si è costantemente alla ricerca di nuovi test diagnostici che siano accurati e poco invasivi. Nel **Capitolo 4** viene riportato lo studio eseguito per valutare le HCC (hair cortisol concentration) in 22 cani con SC al momento della diagnosi, 28 cani con patologie croniche (sick control dogs, SCD) ma senza SC e 40 cani sani. In questo studio la concentrazione di cortisolo nel pelo è stata valutata mediante tecnica RIA ed i risultati sono stati analizzati da un punto di vista statistico per valutare il potenziale utilizzo diagnostico di tale determinazione.

Tale studio ha evidenziato come le HCC risultino significativamente maggiori nei soggetti con SC rispetto ai SCD ed ai cani sani. Questo dato supporta l'ipotesi che le HCC riflettano anche nel cane i valori di cortisolo endogeni in accordo con quanto descritto in medicina umana. Ulteriori studi saranno necessari per valutare se le HCC siano correlate con l'andamento clinico della patologia, e pertanto utili per il monitoraggio terapeutico, così come già dimostrato nell'uomo. Nel nostro studio i campioni di pelo sono stati prelevati in tutti i soggetti dalla regione xifoidea per una miglior compliance del proprietario. Non è ad oggi chiaro se vi possa essere una differenza nelle HCC nelle diverse regioni del corpo e pertanto saranno necessari ulteriori studi a riguardo. Un valore di HCC pari a 1.93 pg/mg ha mostrato una sensibilità del 91% ed una specificità del 61% per la diagnosi di SC. Ulteriori studi saranno necessari al fine di valutare l'influenza del colore del pelo e delle procedure di lavaggio sulle HCC.

Il monitoraggio terapeutico dei cani in terapia con trilostano prevede la valutazione della risoluzione dei sintomi clinici connessi allo stato ipercortisolemico e l'esecuzione del test di stimolazione con ACTH. In particolare la concentrazione del cortisolo post-ACTH (T1) è il parametro comunemente utilizzato per l'adeguamento della dose di farmaco e permette di valutare la presenza di riserva surrenalica in questi soggetti. Vista la difficile reperibilità dell'ACTH sintetico e l'invasività di tale test abbiamo valutato se il livello di cortisolo basale (T0) possa essere un utile parametro ed eventualmente sostituirsi al test di stimolazione con ACTH per il monitoraggio terapeutico di cani in terapia con trilostano. I risultati emersi dallo studio presentato nel **Capitolo 5** mettono in evidenza l'esistenza di una correlazione tra le concentrazioni di cortisolo T0 e T1. Tuttavia la singola valutazione del cortisolo basale non rappresenta un parametro efficace ed accurato per il monitoraggio della terapia con trilostano. Valori di cortisolo T0 > 1,2 µg/dL consentono, di

escludere con buona approssimazione, un ipocortisolismo secondario ad un sovradosaggio del farmaco. Attualmente non esiste nessun test più efficace del test di stimolazione con ACTH, associato alla valutazione clinica dei sintomi, nel fornire informazioni in merito al monitoraggio della terapia con trilostano nei soggetti affetti da SC.

Con l'obiettivo di valutare i fattori prognostici in cani affetti da PDH e sottoposti a terapia con trilostano abbiamo condotto lo studio descritto nel **Capitolo 6**. Età avanzata ed elevate concentrazioni di fosforo sierico sono risultati influenzare negativamente la sopravvivenza. Per quanto riguarda l'età, anche altri studi avevano evidenziato tale correlazione statistica, probabilmente in quanto cani più vecchi tendono ad avere un minor aspettativa di vita rispetto a cani più giovani. Il risultato interessante emerso da questo studio riguarda le concentrazioni di fosforo; al contrario di ciò che accade nell'uomo con SC, nel cane si assiste ad un incremento delle concentrazioni di paratormone (PTH) e fosforo. Il meccanismo eziopatogenetico alla base di tale alterazione non è tutt'ora chiarito, ma tale condizione viene definita "adrenal secondary hyperparathyroidism". Ipotesi possibili a riguardo sono una minor escrezione renale, un aumentato assorbimento intestinale di fosforo o una maggior mobilizzazione ossea. Un'ulteriore ipotesi potrebbe riguardare le dimensioni dell'adenoma ipofisario, in particolare nei soggetti con macroadenomi potrebbe verificarsi una lisi cellulare con rilascio di fosforo intracellulare tale da determinare iperfosfatemia. Ulteriori studi saranno quindi necessari per verificare la possibile correlazione tra le concentrazioni di fosforo e le dimensioni ipofisarie e valutare l'escrezione urinaria di fosforo in questi soggetti.

Nell'uomo la terapia d'elezione in corso di PDH è l'ipofisectomia transfenoidale. In medicina veterinaria è l'unica opzione terapeutica insieme alla radioterapia in corso di macroadenoma ipofisario con sintomatologia neurologica. Nel **Capitolo 7** è stato descritto il primo caso di ipofisectomia transfenoidale eseguito con successo in Italia nel cane. Questo intervento si è dimostrato efficace nel rimuovere adenomi ipofisari anche di grandi dimensioni in soggetti con sintomatologia neurologica. Inoltre nel caso di asportazione incompleta della massa un secondo intervento chirurgico può rappresentare un'opzione possibile ed efficace.

CONCLUSIONI

Gli studi effettuati nell'ambito della presente tesi di dottorato hanno permesso di raggiungere le seguenti conclusioni:

-I cani con Sindrome di Cushing hanno concentrazioni di cortisolo nel pelo (HCC) maggiori rispetto a cani con patologie croniche ed a cani sani.

-La valutazione delle HCC è una metodica poco invasiva la cui applicabilità nella pratica clinica necessita di ulteriori studi.

-Il cortisolo basale non rappresenta un'alternativa al test di stimolazione con ACTH nel monitoraggio della terapia con trilostano.

-Valori di cortisolo basale $>1,2\mu\text{g/dL}$ consentono di escludere con buona approssimazione un ipocortisolismo secondario a sovradosaggio in soggetti con SC sottoposti a terapia con trilostano.

-Età avanzata ed elevate concentrazioni di fosforo sierico, valutate alla diagnosi in soggetti con PDH, successivamente trattati con trilostano, sono variabili che si associano a una minor sopravvivenza.

-L'ipofisectomia transfenoidale in soggetti con macroadenoma ipofisario e sintomi neurologici è una valida opzione terapeutica da considerare in alternativa alla radioterapia.

-

