

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Veterinarie

Ciclo XXXII

Settore Concorsuale: 07/H4

Settore Scientifico Disciplinare: VET/08

***Patologie tiroidee e surrenaliche del cane e del gatto:
aspetti epidemiologici, clinici e clinico-patologici***

Presentata da: *Dott.ssa Gaia Carotenuto*

Coordinatore Dottorato

Prof. Arcangelo Gentile

Supervisore

Prof. Massimo Giunti

Co-supervisore

Prof. Federico Fracassi

Esame finale anno 2020

Sommario

Capitolo 1	1
Introduzione e obiettivi della tesi	
Capitolo 2	13
Ipertiroidismo felino: aspetti clinici e diagnostici	
Capitolo 3	35
La terapia dell'ipertiroidismo felino	
Capitolo 4	57
Symmetric dimethylarginine (SDMA) in hyperthyroid cats	
Capitolo 5	63
Use of tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the measurement of thyroid hormones in dogs with spontaneous hypothyroidism	
Capitolo 6	73
Ipotiroidismo canino: assenza di correlazione fra aspetti clinici e alterazioni clinico-patologiche	
Capitolo 7	89
Symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with hypothyroidism before and after treatment with levothyroxine	
Capitolo 8	107
Cushing's syndrome-an epidemiological study based on a canine population of 21,281 dogs	

Capitolo 9	119
Comparison of different monitoring methods in dogs with hypercortisolism treated with trilostane	
Capitolo 10	129
Fractional excretion of electrolytes in dogs with primary hypoadrenocorticism before and after treatment	
Capitolo 11	135
Incidental adrenal masses in dogs: immunohistochemical features	
Capitolo 12	143
Discussioni e conclusioni	

Capitolo 1

Introduzione e obiettivi della tesi

Le patologie tiroidee e surrenaliche rappresentano alcune delle principali disendocrinie della specie canina e felina. La finalità della presente tesi di dottorato consiste nell'approfondire gli aspetti epidemiologici, clinici e clinico-patologici di tali endocrinopatie.

La prima parte della tesi è incentrata sulle patologie tiroidee; in particolare verranno trattati l'ipertiroidismo felino e l'ipotiroidismo canino.

L'ipertiroidismo felino, diagnosticato per la prima volta nel 1979, rappresenta oggi la più comune endocrinopatia della specie, interessando una percentuale variabile dall'1,5% all'11,4% dei gatti anziani in tutto il mondo. Si tratta di una patologia insidiosa ad eziologia multifattoriale, i cui effetti possono interessare tutto l'organismo o un singolo apparato. In alcuni casi, specialmente quando l'ipertiroidismo è presente da più tempo, la sintomatologia clinica è fortemente indicativa della patologia e il riscontro di elevate concentrazioni di tiroxina circolante permette di giungere facilmente alla diagnosi. Diversamente, diagnosticare l'ipertiroidismo in fase iniziale o in soggetti con patologie concomitanti che possono complicare il quadro clinico e clinico-patologico può risultare più complesso. Conoscere gli aspetti clinici e diagnostici dell'ipertiroidismo felino (**capitolo 2**) è importante per effettuare una diagnosi precoce. Il riconoscimento della patologia permette di prevenire ed eventualmente intervenire tempestivamente sulle complicazioni conseguenti alle elevate concentrazioni di ormoni tiroidei (es. danno renale e cardiaco) e, in generale, permette una migliore gestione del paziente.

2

Le opzioni terapeutiche comprendono la terapia con iodio radioattivo, la tiroidectomia, l'uso di farmaci antitiroidei e una dieta a forte restrizione di iodio. Il **capitolo 3** propone una revisione della letteratura in merito alle opzioni terapeutiche ad oggi disponibili per il trattamento dell'ipertiroidismo felino.

La funzionalità renale è uno dei principali fattori che condiziona l'approccio terapeutico nei gatti ipertiroidei. Nefropatia cronica (CKD, *chronic kidney disease*) e ipertiroidismo sono comorbidità frequenti nei gatti anziani. È dimostrato che elevate concentrazioni circolanti di ormoni tiroidei, determinando una sarcopenia generalizzata, un aumento del GFR e una riduzione delle concentrazioni di creatinina sierica (sCr, serum creatinine), possono mascherare la presenza di una nefropatia sottostante. A testimonianza di ciò, basti pensare che l'iperazotemia è stata riportata in circa il 10% dei gatti ipertiroidei al momento della diagnosi e che questa percentuale aumenta fino a raggiungere una prevalenza del 60% una

volta attuata la terapia per l'endocrinopatia¹⁻³. L'identificazione precoce di una ridotta funzionalità renale nei gatti ipertiroidei permette di scegliere il trattamento più adeguato per l'ipertiroidismo e di poter trattare la CKD fin dagli stadi precoci. La dimetilarginina simmetrica (SDMA, *symmetric dimethylarginine*) è nuovo biomarker di funzionalità renale; essa deriva dalla metilazione proteica intracellulare, non è legata alle proteine plasmatiche e viene escreta principalmente per via renale (>90%)⁴. Ha una buona correlazione con il GFR e con la sCr sia in gatti sani sia in gatti con CKD e, a differenza della sCr, ha il vantaggio di essere meno influenzata da fattori extrarenali quali la massa muscolare, l'elevato *intake* proteico con la dieta e l'età del soggetto⁵⁻⁸. Queste caratteristiche fanno supporre che l'SDMA rappresenti un marker migliore di funzionalità renale rispetto alla sCr nei gatti ipertiroidei. L'andamento dell'SDMA è stato valutato nei gatti ipertiroidei prima e dopo radioiodioterapia e tiroidectomia^{9,10}. Nel **capitolo 4** è stato indagato il ruolo dell'SDMA come marker di funzionalità renale nei gatti ipertiroidei, valutandone le concentrazioni alla diagnosi e dopo terapia medica con metimazolo.

Contrariamente a quanto si osserva nel gatto, la principale patologia tiroidea della specie canina è l'ipotiroidismo primario acquisito. Si tratta della patologia tiroidea più diffusa, nonché una delle patologie endocrine più comuni nel cane, la cui prevalenza è stata stimata tra lo 0,2 e lo 0,8%. Le alterazioni cliniche e clinico-patologiche conseguenti alla persistente carenza di ormoni tiroidei sono solitamente aspecifiche. La diagnosi richiede pertanto la valutazione combinata dell'anamnesi, dell'esame fisico diretto, la valutazione del profilo emato-chimico e di indagini ormonali specifiche per testare la funzionalità tiroidea [tiroxina totale (TT₄) e tireotropina canina (cTSH)]. Il riscontro di basse concentrazioni di TT₄ associate ad un aumento del cTSH, in un soggetto con segni clinici compatibili, permette di effettuare la diagnosi nel 60-70% dei casi. Tuttavia, circa nel 30% dei cani ipotiroidei la concentrazione sierica di cTSH è nei range di riferimento¹¹; in questi casi non è possibile distinguere tra ipotiroidismo ed *euthyroid sick syndrome* o *non-thyroidal illness syndrome*. È infatti ampiamente dimostrato che le concentrazioni sieriche di ormoni tiroidei sono influenzate dalla presenza di patologie sistemiche, una condizione multifattoriale che determina una *downregulation* dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide con conseguente diminuzione degli ormoni tiroidei circolanti, una diminuzione della deiodinazione periferica del T₄ e un aumento della deiodinazione del T₃, mentre la concentrazione di cTSH rimane, di solito, entro i range di riferimento. In questi casi diventa necessario ricorrere all'uso del test di stimolazione con rhTSH (recombinant human

thyroid stimulating hormone) o alla scintigrafia tiroidea, considerati il *gold standard* per la diagnosi^{12,13}. Tuttavia, non sono indagini facilmente attuabili nella pratica clinica in quanto costose e disponibili quasi esclusivamente presso centri di referenza. Ne deriva l'utilità di indagare possibili metodi alternativi per giungere a una diagnosi di ipotiroidismo il più accurata possibile. In medicina umana la cromatografia liquida ad elevata prestazione abbinata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) è considerata la metodica d'elezione per la misurazione di diversi ormoni, tra cui gli ormoni tiroidei, ed è ampiamente utilizzata nella pratica clinica. Nel **capitolo 5** è riportato lo studio volto ad indagare le performance diagnostiche della misurazione, tramite LC-MS/MS, di 5 differenti forme di ormoni tiroidei [free T₃, free T₄, 3,3',5'-triiodotironina (rT₃), 3,3-diiodotironina (3,3-T₂) e 3,5-diiodotironina (3,5-T₂)] nel discriminare tra cani sani, cani ipotiroidei e cani con *non-thyroidal illness syndrome*.

Uno studio sperimentale¹⁴ ha dimostrato come i cani affetti da ipotiroidismo insorto da tempo possano presentare una concentrazione di cTSH nella norma, ipotizzando che la persistente stimolazione delle cellule tireotrope ipofisarie determini, tramite un *feedback* negativo, una progressiva desensibilizzazione dei recettori ipofisari del TRH e una conseguente diminuzione della secrezione del cTSH. L'iniziale stimolazione da parte del cTSH promuoverebbe, inoltre, la mitosi di cellule tireotrope preesistenti, determinando una minore differenziazione delle cellule staminali e portando così allo sviluppo di cellule tireotrope non-secernenti. Pertanto, se ciò fosse vero, i soggetti ipotiroidei con cTSH normale, essendo malati da più tempo, quando non sottoposti a terapia, dovrebbero presentare un quadro clinico e clinico-patologico più marcato rispetto ai cani ipotiroidei con elevate concentrazioni di cTSH. Ad oggi, nessuno studio ha valutato se la gravità del quadro clinico in cani ipotiroidei si correli o meno alle alterazioni clinico-patologiche associate alla patologia. Per questo motivo lo studio riportato nel **capitolo 6** ha avuto l'obiettivo di valutare la presenza di una possibile correlazione tra la gravità della condizione clinica dei pazienti ipotiroidei, le variabili ematochimiche e le concentrazioni sieriche di cTSH. Al fine di classificare la gravità del quadro clinico, è stato ideato uno specifico *score* assegnando un punteggio a ciascuna alterazione clinica riscontrata in anamnesi e all'esame fisico. I soggetti ipotiroidei sono quindi stati suddivisi nei gruppi *high clinical score* (HCS, segni clinici più evidenti e gravi) e *low clinical score* (LCS, segni clinici meno evidenti e meno gravi) ed è stato valutato se fossero presenti differenze significative in merito a segnalamento, *score* clinico, alterazioni emato-chimiche e test ormonali, tra cani ipotiroidei

con concentrazioni di cTSH all'interno dei range di riferimento e cani ipotiroidei con livelli di cTSH al di sopra dell'intervallo di riferimento.

Le principali alterazioni clinico-patologiche riportate nei cani ipotiroidei riguardano la presenza di anemia normocitica normocromica non rigenerativa, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia e aumento delle transaminasi epatiche; solo raramente si assiste ad un aumento della creatinina sierica. Le conseguenze che una alterata concentrazione di ormoni tiroidei esercitano sulla funzionalità renale, sia direttamente che indirettamente (effetti metabolici, cardiovascolari ed emodinamici), sono state ben definite sia in medicina umana che veterinaria. In medicina umana l'ipotiroidismo è associato ad una riduzione del GFR e, alla diagnosi, è frequente (32-54%) il riscontro di elevati livelli di creatinina sierica che tendono a normalizzarsi in corso di terapia¹⁵⁻¹⁷. Anche in medicina veterinaria, l'ipotiroidismo canino è stato associato ad una riduzione del GFR valutato mediante test di clearance plasmatica della creatinina esogena¹⁸. In letteratura è riportato un aumento della creatinina sierica in corso di ipotiroidismo canino, ma nella maggior parte dei casi, i valori assoluti rimangono entro gli intervalli di normalità¹⁹. La SDMA, come già citato precedentemente, è un nuovo biomarker di funzionalità renale che si è dimostrato essere più sensibile e specifico rispetto alla sCr, consentendo di anticipare la diagnosi di malattia renale cronica di molti mesi sia nel cane che nel gatto. Se in medicina umana studi clinici condotti su pazienti ipotiroidei hanno riportato un aumento dei livelli sierici di SDMA²⁰, in medicina veterinaria non ci sono studi a riguardo. A questo scopo, abbiamo voluto valutare l'andamento della concentrazione sierica di alcuni biomarker di funzionalità renale, quali SDMA, sCr e urea, in una popolazione di cani ipotiroidei alla diagnosi e dopo supplementazione ormonale con levotiroxina sodica e li abbiamo confrontati con una popolazione di cani sani (**capitolo 7**).

La seconda parte della tesi riguarda le patologie surrenaliche della specie canina, in particolare verranno tratti l'ipercortisolismo, l'ipoadrenocorticismo e gli incidentalomi surrenalici.

L'ipercortisolismo spontaneo (HC, *spontaneous hypercortisolism*) nella specie canina è causato nell'80-85% dei casi dall'ipersecrezione di ormone adrenocorticotropo (ACTH, *adrenocorticotropic hormone*) ad opera di un adenoma ipofisario (PDH, *pituitary-dependent hypercortisolism*); nella restante percentuale dei casi è la conseguenza dell'ipersecrezione di glucocorticoidi da parte di tumori adrenocorticali benigni o maligni (ADH, *adrenal-dependent hypercortisolism*). Indipendentemente dall'eziologia, quello che ne consegue è

un'ipercortisolismo cronico e patologico che porta ad alterazioni cliniche e laboratoristiche peculiari. A differenza della Sindrome di Cushing dell'uomo che è considerata una malattia rara, con un'incidenza che varia da 0,7 a 2,4 casi/milione/anno, nel cane l'HC è una delle endocrinopatie più comuni. Un recente studio epidemiologico ne ha stimato la prevalenza in una popolazione canina in Inghilterra attorno allo 0,28%²¹. Alcune razze canine sembrano essere predisposte allo sviluppo della patologia e la maggiore parte degli studi è concorde nell'identificare una frequenza maggiore in cani di mezza età o anziani; al contrario, ci sono opinioni discordanti per quanto riguarda la predisposizione legata al sesso. Le conoscenze attuali sugli aspetti epidemiologici dell'HC sono limitate a pochi studi nella maggiore parte dei quali manca il confronto con una popolazione di controllo. Per questo motivo abbiamo voluto indagare gli aspetti epidemiologici dell'HC in una popolazione canina italiana (**capitolo 8**). Nell'indagine sono state coinvolte, oltre all'Università di Bologna riconosciuta come centro di referenza per l'HC, altre 4 cliniche private dislocate sul territorio. Inoltre, mediante il confronto con una popolazione di controllo, è stato possibile indagare i fattori di rischio associati a tale endocrinopatia.

6

L'HC, pur non essendo una patologia che necessita di un trattamento "*salvavita*", può determinare gravi complicazioni (es. diabete mellito, ipertensione, tromboembolismo polmonare, pielonefriti) e ha un notevole impatto sulla qualità di vita dell'animale. L'eliminazione dei segni clinici causati dall'eccesso di glucocorticoidi è il principale obiettivo terapeutico, che può essere conseguito mediante approccio medico o intervento chirurgico (surrenalectomia in corso di ADH, ipofisectomia transfenoidale in corso di PDH). Il trilostano rappresenta il trattamento medico di prima scelta per l'HC canino; esso determina una ridotta sintesi di glucocorticoidi e, in minor misura, di mineralcorticoidi inibendo l'enzima 3 β -idrossisteroide-deidrogenasi. Il monitoraggio della terapia con trilostano, per evitare sovra o sottodosaggi, riveste un ruolo cruciale nella gestione di questi pazienti. Da quando è stato immesso in commercio il trilostano, alla fine degli anni 90', il test di stimolazione con ACTH sintetico è stato il metodo maggiormente utilizzato per il monitoraggio, nonostante non sia mai stato validato per tale scopo. L'analogo sintetico dell'ACTH, il tetracosactide, può essere estremamente costoso e difficile da reperire, specialmente in alcuni paesi. Uno studio effettuato sui ratti ha inoltre dimostrato che la somministrazione di ACTH può causare necrosi surrenalica²². Dati recenti hanno evidenziato una mancata correlazione tra i risultati del test di stimolazione e lo stato clinico del cane in corso di terapia medica²³. Per questi motivi, negli

ultimi 10 anni sono state condotte numerose ricerche volte ad identificare un metodo di monitoraggio alternativo al test di stimolazione con ACTH. In particolare, sono stati indagati diversi parametri quali: cortisolo basale, ACTH endogeno, rapporto cortisolo/ACTH, proteine di fase acuta positive (aptoglobina sierica, sieroamiloide A, proteina C reattiva) e rapporto cortisolo/creatinina urinaria (UCCR), ma nessuno di questi sembra avere una maggiore affidabilità rispetto al test di stimolazione²⁴⁻³². Due gruppi di ricerca hanno indagato se l'analisi dei soli segni clinici potesse rappresentare una possibile alternativa per il monitoraggio terapeutico. I risultati sono stati discordanti: nel primo studio non è stata osservata una correlazione tra la gravità dei segni clinici e i risultati del test di stimolazione con ACTH³³, nel secondo è stata dimostrata una debole correlazione tra i due parametri³⁴. In un altro studio, ai proprietari dei cani in terapia è stato sottoposto un questionario clinico standardizzato volto ad indagare l'entità dei segni clinici più comunemente associati ad ipercortisolismo e il loro ruolo relativo nella valutazione del trattamento con trilostano³⁵. I risultati ottenuti dai questionari venivano poi correlati con le concentrazioni di cortisolo ottenute prima della somministrazione del trilostano (*prepill*), a 3 ore dal farmaco e post-ACTH. Nessuna misurazione ormonale si correlava in modo significativo allo *score* clinico, concludendo che quest'ultimo potrebbe rappresentare uno strumento più efficace per il monitoraggio terapeutico. Data l'importanza di individuare un metodo di monitoraggio alternativo al test di stimolazione, abbiamo voluto esaminare, all'interno della stessa popolazione di cani affetti da HC e in terapia con trilostano, quali dei parametri si correlassero meglio con lo *score* clinico standardizzato proposto da Macfarlane e coll. (2016) ed ottenuto tramite un questionario compilato dal proprietario (**capitolo 9**)³⁵. Tale *score* clinico è stato utilizzato come metodica "gold standard" per il confronto dei dati. I parametri messi a confronto con lo *score* clinico sono stati: 1) concentrazione di cortisolo sierico pre-trilostano (*prepill* o T0); 2) concentrazione di cortisolo sierico a 3 ore dal farmaco (T3); 3) concentrazione di cortisolo sierico post stimolazione con ACTH (T4); 4) concentrazione di aptoglobina sierica (Hp); 5) rapporto tra le varie concentrazioni di cortisolo sierico (T0, T3 e T4) e l'ACTH endogeno; 6) variabili biochimiche sieriche quali ALT, γ GT e ALP; 7) rapporto tra cortisolo urinario e creatinina urinaria (UCCR); 8) peso specifico urinario.

Al contrario dell'HC, l'ipoadrenocorticism primario (PH, *primary hypoadrenocorticism*) è una endocrinopatia non comune nel cane caratterizzata da un'insufficiente produzione di glucocorticoidi e di mineralcorticoidi da parte delle ghiandole surrenali. La funzione

dell'aldosterone consiste nel promuovere il riassorbimento di sodio e cloro e l'escrezione di potassio a livello tubulare renale; pertanto, una sua carenza si ripercuote sulle concentrazioni di tali elettroliti a livello sierico e urinario. Mentre le alterazioni sieriche, tipicamente iponatremia e iperkaliemia, sono state ampiamente studiate, al contrario, pochissime sono le informazioni presenti in letteratura riguardo i livelli elettrolitici urinari in corso di PH nel cane. In medicina umana è nota l'utilità della valutazione della natriuresi per sospettare o escludere la patologia in pazienti iponatremici; diversamente, un unico studio sull'ipoadrenocorticismo canino ha indagato l'utilità diagnostica dell'escrezione elettrolitica urinaria, ma esaminando esclusivamente i livelli assoluti di sodio e non le singole frazioni escretorie elettrolitiche (FEe, *fractional excretion of electrolytes*)³⁶. L'adeguatezza della supplementazione con mineralcorticoidi nell'uomo si basa sulla valutazione di variabili cliniche, biochimiche e sulla misurazione dell'attività della renina plasmatica (PRA, *plasma renin activity*): valori normali di pressione arteriosa, concentrazioni elettrolitiche ematiche all'interno degli intervalli di riferimento ed un valore di PRA nel limite superiore dell'intervallo di riferimento indicano un buon controllo della patologia³⁷. Nel cane, per modificare la dose della terapia con mineralcorticoidi, ci si basa prevalentemente sulla concentrazione sierica di sodio e potassio. Studi condotti su cani con PH in terapia con desossicorticosterone pivalato (DOCP) hanno dimostrato come, a fronte di concentrazioni elettrolitiche nei range, la PRA risultava soppressa³⁸. In medicina umana, il riscontro di valori soppressi di PRA è indicativo di un sovradosaggio del farmaco, condizione da evitare poiché determina ipertensione e il potenziale sviluppo di complicazioni a lungo termine. Sfortunatamente la misurazione della PRA non è applicabile nella pratica clinica veterinaria a causa degli elevati costi, della difficoltà nella gestione dei campioni (devono arrivare congelati) e nel reperire un laboratorio che ne esegua la misurazione (attualmente solo Cambridgein Specialist Laboratory Service in Europa). Da quanto detto si evince la necessità di individuare un metodo di monitoraggio che possa aggiungere informazioni utili rispetto alla sola misurazione degli elettroliti sierici. Lo studio riportato nel **capitolo 10** ha avuto gli obiettivi di calcolare le frazioni escretorie degli elettroliti per valutare se queste rispecchiassero le concentrazioni degli elettroliti a livello ematico e per indagare se le FEe potessero rappresentare un supporto alla diagnosi e al trattamento del PH. Le FEe sono state confrontate tra i seguenti gruppi di cani: 1) cani con insufficienza surrenalica acuta (AAI, *acute adrenal insufficiency*) prima del trattamento, cani sani (HD, *healthy dogs*) e cani in terapia (TD, *treated dogs*) per PH sia con DOCP che con fludrocortisone acetato; 2) cani

con PH in terapia con DOCP classificati in base alla qualità del controllo in: ben controllati (sodio e potassio nei range di riferimento), scarsamente controllati (iponatremia e/o iperkaliemia) ed eccessivamente controllati (ipernatremia e/o ipokaliemia); 3) cani in terapia con DOCP con un buon controllo della patologia, classificati in base al tempo trascorso dalla somministrazione del DOCP: 9-15, 23-27 e 28-33 giorni.

Uno scenario completamente diverso nell'ambito delle patologie surrenaliche nel cane è rappresentato dal riscontro accidentale di masse surrenaliche (AIs, *adrenal incidentalomas*) che rappresenta un'evenienza sempre più frequente per via della maggiore diffusione e della migliore qualità di strumenti diagnostici quali ecografia addominale e TC. In letteratura sono presenti pochi studi riguardo gli AI e le informazioni sulla diagnosi istopatologica sono limitate. Una corretta diagnosi è fondamentale per poter intraprendere la strategia terapeutica adeguata, pianificare il *follow-up* e poter fornire informazioni prognostiche. In alcuni casi la distinzione morfologica tra tumori adrenocorticali e midollari e la differenziazione tra forme benigne e maligne possono risultare complesse con l'approccio istopatologico standard. Nell'uomo, l'utilizzo di marker immunoistochimici specifici aumenta l'accuratezza diagnostica e l'espressione percentuale del Ki-67 è predittiva di malignità sia nei tumori adrenocorticali che nel feocromocitoma, sebbene non sia possibile stabilire un preciso valore di cut-off. Nel cane, la valutazione del Ki-67, assieme ad altri criteri istologici, sembra essere utile per differenziare l'adenoma dal carcinoma adrenocorticale³⁹. Tale marker è, inoltre, parte integrante di uno score istopatologico sviluppato di recente presso l'università di medicina veterinaria di Utrecht, per predire la malignità dei tumori adrenocorticali cortisolo-secernti⁴⁰. Pertanto, l'obiettivo dello studio riportato nel **capitolo 11** consiste nel descrivere le caratteristiche immunoistochimiche e l'espressione del Ki-67 degli incidentalomi surrenalici nel cane.

Nel **capitolo 12** sono riassunte le discussioni e le conclusioni della presente tesi.

Bibliografia dell'introduzione

1. van Hoek I and Daminet S. Interactions between thyroid and kidney function in pathological conditions of these organ systems: a review. *General and Comparative Endocrinology* 160:205-215, 2009.
2. Williams TL, Peak KJ, Brodbelt D, *et al.* Survival and the development of azotemia after treatment of hyperthyroid cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24:863-869, 2010.
3. Williams TL, Elliot J and Syme HM. Effect on renal function of restoration of euthyroidism in hyperthyroid cats with iatrogenic hypothyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:1251-1255, 2014.
4. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, *et al.* Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function. A meta-analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 21:2446-2451, 2006.
5. Braff J, Obare E, Yerramilli M, *et al.* Relationship between serum symmetric dimethylarginine concentration and glomerular filtration rate in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:1699-1701, 2014.
6. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, *et al.* Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:1676-1683, 2014a.
7. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, *et al.* Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *The Veterinary Journal* 202:588-596, 2014b.
8. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, *et al.* Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:808-814, 2015.
9. Buresova E, Stock E, Paepe D, *et al.* Assessment of symmetric dimethylarginine as a biomarker of renal function in hyperthyroid cats treated with radioiodine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33:516-522, 2019.
10. Covey HL, Chang YM, Elliott J *et al.* Changes in thyroid and renal function after bilateral thyroidectomy in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33:508-515, 2019.
11. Peterson ME, Melián C, Nichols R. Measurement of serum total thyroxine, triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations for diagnosis of hypothyroidism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211:1396-1402, 1997.
12. Daminet S, Fifle L, Paradis M *et al.* Use of recombinant human thyroid-stimulating hormone for thyrotropin stimulation test in healthy, hypothyroid and euthyroid sick dogs. *The Canadian Veterinary Journal* 48:1273-1279, 2007.
13. Diaz-Espiñeira MM, Mol JA, Peeters ME *et al.* Assessment of thyroid function in dogs with low plasma thyroxine concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21:25-32, 2007.
14. Diaz-Espiñeira MM, Mol JA, van den Ingh TS, *et al.* Functional and morphological changes in the adenohypophysis of dogs with induced primary hypothyroidism: loss of TSH hypersecretion,

- hypersomatotropism, hypoprolactinemia, and pituitary enlargement with transdifferentiation. *Domestic Animal Endocrinology* 35:98-11, 2008.
15. Montenegro J, González O, Saracho R, *et al.* Changes in renal function in primary hypothyroidism. *American Journal of Kidney Disease* 27:195-198, 1996.
 16. den Hollander JG, Wulkan RW, Mantel MJ, *et al.* Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function. *Clinical Endocrinology* 62:423-427, 2005.
 17. Asvold BO, Bjørro T, Vatten LJ. Association of thyroid function with estimated glomerular filtration rate in a population-based study: the HUNT study. *European Journal of Endocrinology* 164:101-105, 2011.
 18. Gommeren K, van Hoek I, Lefebvre HP, *et al.* Effect of thyroxine supplementation on glomerular filtration rate in hypothyroid dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:844-849, 2009.
 19. Panciera DL, Lefebvre HP. Effect of experimental hypothyroidism on glomerular filtration rate and plasma creatinine concentration in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:1045-1050, 2009.
 20. Arikan E, Karadag CH and Guldiken S. Asymmetric dimethylarginine levels in thyroid diseases. *Journal of Endocrinological Investigation* 30:186-191, 2007.
 21. O'Neill DG, Scudder C, Faire JM, *et al.* Epidemiology of hyperadrenocorticism among 210,824 dogs attending primary-care veterinary practices in the UK from 2009 to 2014. *Journal of Small Animal Practice* 57:365-373, 2016.
 22. Burkhardt WA, Guscetti F, Boretti FS, *et al.* Adrenocorticotrophic hormone, but not trilostane, causes severe adrenal hemorrhage, vacuolization, and apoptosis in rats. *Domestic Animal Endocrinology* 40: 155-164, 2011.
 23. Boretti, F, Holzthuem J, Reusch CE, *et al.* Lack of association between clinical signs and laboratory parameters in dogs with hyperadrenocorticism before and during trilostane treatment. *Schweiz Arch Tierheilkd* 158:631-638, 2016.
 24. Witt A L and Neiger R. Adrenocorticotrophic hormone levels in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism following trilostane therapy. *The Veterinary Record* 154:399-400, 2004.
 25. McGrotty YL, Arteaga A, Knottenbelt CM, *et al.* Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. *Veterinary Clinical Pathology* 34:255-258, 2005.
 26. Galac S, Buijtel JJ and Kooistra HS. Urinary corticoid: creatinine ratios in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism during trilostane treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:1214-1219, 2009.
 27. Arteaga A, Dhand NK, McCann T, *et al.* Monitoring the response of canine hyperadrenocorticism to trilostane treatment by assessment of acute phase protein concentrations. *Journal of Small Animal Practice* 51: 204-209, 2010.
 28. Cook AK and 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.
 29. 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.

30. Midence JN, Drobatz KJ and Hess RS. Cortisol concentrations in well-regulated dogs with hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:1529-1533, 2015.
31. Woolcock AD, Bugbee AC and Creevy KE. Evaluation of baseline cortisol concentration to monitor efficacy of twice-daily administration of trilostane to dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 22 cases (2008–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 248:814-821, 2016.
32. Boretti F, Musella C, Burkhardt W *et al.* Comparison of two prepill cortisol concentrations in dogs with hypercortisolism treated with trilostane. *BMC Veterinary Research* 14:417, 2018.
33. Wehner A, Gloeckner S, Sauter-Louis C, *et al.* Association between ACTH stimulation test, clinical signs, and laboratory parameters in dogs with hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:743, 2014.
34. Ramsey I, Parkin T and Cosgrove L. Assessment of a novel methods of monitoring trilostane treatment of canine hyperadrenocorticism. Abstract BSAVA congress. Birmingham (UK).2015,pp 493..
35. Macfarlane L, Parkin T and Ramsey I. Pre-trilostane and three-hour post-trilostane cortisol to monitor trilostane therapy in dogs. *Veterinary Record* 179:597, 2016.
36. Lennon EM, Hummel JB and Vaden SL. Urine sodium concentrations are predictive of hypoadrenocorticism in hyponatraemic dogs: a retrospective pilot study. *Journal of Small Animal Practice* 59: 228-231, 2018.
37. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, *et al.* Diagnosis and treatment of primary adrenal insufficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101:364-389, 2016.
38. Baumstark ME, Nussberger J, Boretti FS, *et al.* Use of plasma renin activity to monitor mineralocorticoid treatment in dogs with primary hypoadrenocorticism: desoxycorticosterone versus fludrocortisone. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:1471-1478, 2014.
39. Labelle P, Kyles AE, Farver TB and De Cock HE. Indicators of malignancy of canine adrenocortical tumors: histopathology and proliferation index. *Veterinary Pathology*. 41:490-497, 2004.
40. Sanders K, Cirkel K, Grinwis GCM, *et al.* The Utrecht Score: a novel histopathological scoring system to assess the prognosis of dogs with cortisol-secreting adrenocortical tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 17:329-337, 2019.

Capitolo 2

Iperteroidismo felino: aspetti clinici e diagnostici

*G. Carotenuto, F. Fracassi
Veterinaria 2019; 33(2):69-80*

RIASSUNTO

L'ipertiroidismo felino è una patologia ad eziologia multifattoriale che rappresenta oggi l'endocrinopatia più comune di questa specie. Nella maggiore parte dei casi è dovuto alla presenza di un'iperplasia adenomatosa che può coinvolgere uno o entrambi i lobi tiroidei, più raramente può essere conseguente ad un carcinoma o alla presenza di tessuto tiroideo ectopico. Si tratta di una patologia insidiosa e progressiva i cui effetti possono interessare tutto l'organismo. La maggior parte dei soggetti si presenta in uno stato di nutrizione scadente e in oltre il 90% dei casi è possibile apprezzare un nodulo tiroideo palpabile. Gli esami emato-biochimici di base e l'esame delle urine sono utili soprattutto per escludere altre patologie e in parte permettono di supportare la diagnosi che deve essere confermata dal riscontro di elevate concentrazioni di ormoni tiroidei o dalla scintigrafia tiroidea che evidenzia un'aumentata captazione di radioisotopi.

ABSTRACT

14

Feline hyperthyroidism (FHT) is the most common endocrine disorder of these specie and has a multifactorial origin. In most cases FHT is due to adenomatous hyperplasia of one or both thyroid lobes, less frequently it may be the consequence of a thyroid carcinomas or due to the presence of ectopic thyroid tissue. FHT is a chronically progressive and insidious disease, and the clinical signs can vary from mild to severe. The majority of the cats with hyperthyroidism shows clinically poor body conditions and more than 90% has a palpable goiter. A complete blood cell count, serum biochemistry, and urinalysis are useful in supporting the diagnosis or excluding other diseases; a definitive diagnosis requires demonstration of persistently elevated thyroid hormone concentrations or increased radioisotope uptake after thyroid scintigraphy.

INTRODUZIONE

L'ipertiroidismo felino è stato descritto per la prima volta nel 1979,^{1,2} da allora, la frequenza della patologia è andata progressivamente aumentando fino ad oggi dove rappresenta la più comune endocrinopatia della specie. Attualmente viene diagnosticato nell'1,5-11,4% dei gatti anziani in tutto il mondo.^{3,4,5} L'ipertiroidismo felino è una patologia sistemica secondaria a un'eccessiva produzione e secrezione di tiroxina (T₄) e triiodotironina (T₃) da parte della tiroide. Nella maggior parte dei casi la patologia è dovuta alla presenza di un'iperplasia adenomatosa tiroidea (gozzo nodulare tossico) (Figura 1), simile alla malattia di Plummer dell'uomo, oppure, meno frequentemente, ad un adenoma tiroideo.^{6,7}

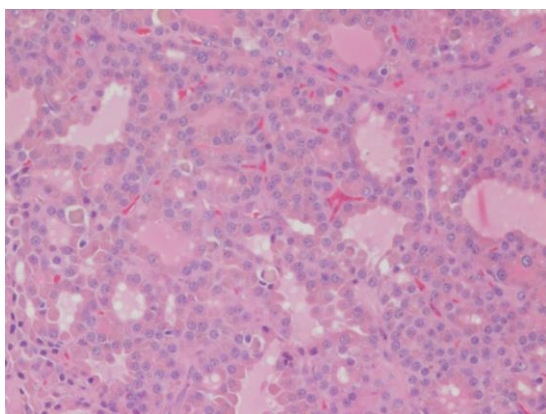


Figura 1 - Esame istologico di nodulo tiroideo iperplastico asportato chirurgicamente ad un gatto europeo maschio castrato di 14 anni. Proliferazione iperplastica dei follicoli tiroidei che assumono dimensioni variabili. I follicoli sono bordati da epitelio da colonnare a cuboidale e contengono colloide in quantità variabile. Le cellule epiteliali presentano moderato citoplasma eosinofilo finemente granulare e nucleo rotondo basale con nucleoli singoli ben evidenti. Anisocitosi e anisocariosi sono lievi. Le mitosi sono rare. Non si osserva tessuto tiroideo normale.

Ad oggi non sono descritti casi analoghi alla patologia di Graves umana, nella quale l'ipertiroidismo è la conseguenza di un processo immunomediato. All'esame istologico della tiroide si assiste ad un sovvertimento della normale architettura follicolare per la presenza di aree ben circoscritte di tessuto iperplastico che possono organizzarsi in noduli del diametro variabile da meno di 1 mm a più di 3 cm.² Nella maggiore parte dei gatti ipertiroidei la patologia coinvolge entrambi i lobi tiroidei (63%), mentre in un numero inferiore di casi vi è un interessamento monolaterale (32%) o una presentazione multifocale (4%) della malattia.^{8,9} In circa il 4% dei casi l'ipertiroidismo può essere dato da iperplasia di tessuto tiroideo ectopico che può manifestarsi come lesione singola o multifocale (3 o più noduli caldi).⁹ Solo nel 2% dei casi l'ipertiroidismo è causato da un carcinoma tiroideo,^{10,11,12} tuttavia, gli adenomi tiroidei possono continuare a crescere ed evolvere in forme maligne soprattutto in gatti trattati con metimazolo per lunghi periodi.^{11,13}

L'eziologia dell'ipertiroidismo è complessa e multifattoriale; sono stati presi in causa fattori genetici, immunologici e nutrizionali senza tuttavia individuare il ruolo predominante di uno rispetto agli altri.^{3,14,15} Anche l'esposizione cronica a interferenti endocrini attraverso l'ambiente, la dieta o l'acqua potrebbe ricoprire un ruolo nella patogenesi dell'ipertiroidismo, così come dimostrato per le patologie tiroidee nell'uomo.^{16,17} Ad esempio, il Bisfenolo A (BPA), un plasticizzante utilizzato per il rivestimento interno delle lattine, può contaminare l'alimento e, una volta assorbito, interferire con l'asse tiroideo.^{3,18,19} Recenti studi hanno dimostrato la presenza di alti livelli nel siero di gatti di un altro gruppo di contaminanti ambientali, i polibromodifenileteri (PBDE), anch'essi noti per le loro caratteristiche nocive.^{20,21} I PBDE fanno parte dei ritardanti di fiamma e, come tali, si ritrovano in un'ampia gamma di prodotti (es: plastiche, articoli tessili e apparecchiature elettroniche). Tali molecole possono migrare e unirsi alla polvere dove raggiungono alte concentrazioni.²² I gatti domestici, considerate le loro abitudini, possono quindi venire in contatto con queste sostanze sia attraverso la via alimentare che tramite il grooming e, condividendo lo stesso ambiente dell'uomo, rappresentano l'animale sentinella per le contaminazioni ambientali domestiche.²³

ASPETTI CLINICI E DIAGNOSTICI DELL'IPERTIROIDISMO FELINO

SEGNALAMENTO

Non vi sono predisposizioni di razza o sesso per lo sviluppo dell'ipertiroidismo, tuttavia è stata ipotizzata una sorta di "protezione genetica" poiché alcune razze, quali il Siamese e l'Himalayano, presentano un'incidenza minore della patologia.^{5,15,24,25,26}

Nella maggior parte dei casi la diagnosi viene effettuata a 12-13 anni di età (range 4-22) e in meno del 5% dei soggetti è diagnosticato ad un'età inferiore ai 10 anni. In letteratura esiste solo un caso di ipertiroidismo giovanile dove la patologia è stata riscontrata in un gattino di 8 mesi.²⁷

PRESENTAZIONE CLINICA

Si tratta di una patologia insidiosa e progressiva i cui effetti possono interessare tutto l'organismo o interessare un singolo apparato. La presentazione clinica e la gravità dei segni clinici sono variabili e dipendono dalle capacità di adattamento dell'organismo, dalla durata e dalla presenza o meno di patologie concomitanti. Il segno clinico più comune è la perdita di

peso (Figura 2), presente nel 90% circa dei soggetti, associata spesso a polifagia; entrambi questi sintomi sono legati ad un accelerato metabolismo secondario alla patologia. Il dimagrimento può essere lieve o esitare in cachessia cui si può associare atrofia muscolare per un aumentato catabolismo proteico.²⁸ Comunemente si osserva vomito ed occasionalmente diarrea (aumentata frequenza di defecazione, aumento di volume delle feci o steatorrea).^{8,29} La presenza di vomito può essere dovuta all'azione diretta degli ormoni tiroidei sulla *chemoreceptor trigger zone* o conseguente alla distensione gastrica per eccessiva voracità. L'aumento del transito gastrointestinale e la maggiore ingestione di grassi dovuta alla polifagia possono a volte portare a diarrea.^{29,30}

In meno della metà dei soggetti è segnalata la presenza di poliuria/polidipsia. L'aumento dell'output urinario può essere una conseguenza diretta o indiretta dell'ipertiroidismo che porta ad un aumento della velocità di filtrazione glomerulare (GFR, *glomerular filtration rate*) e del flusso ematico alla midollare (RBF, *renal blood flow*) con conseguente ipotonicità della midollare. L'ipertiroidismo può causare uno stato di ipertensione sistemica che riflettendosi a livello glomerulare e, in assenza di autoregolazione, può determinare sclerosi glomerulare.^{31,32} La poliuria può essere dovuta anche ad un disturbo renale preesistente evidente solo dopo il trattamento dell'ipertiroidismo. L'azione degli ormoni tiroidei a livello ipotalamico può inoltre essere causa di polidipsia primaria (polidipsia psicogena).



Figure 2, 3, 4, 5 - Gatto europeo maschio di 14 anni affetto da ipertiroidismo. Si noti lo scarso stato di nutrizione e lo scadente stato del mantello (2). Gatto persiano anni 14 affetto da ipertiroidismo. Si noti il mantello opaco e poco curato (3). Gatto europeo anni 15 affetto da ipertiroidismo. Si noti lo scadente stato generale del soggetto (4). Gatto europeo maschio. Si noti il gozzo dovuto allo sviluppo di un carcinoma tiroideo (5).

All'esame fisico la maggior parte dei soggetti si presenta in stato di nutrizione scadente, con mantello ispido, trasandato (Figura 2,3,4), talvolta possono essere presenti aree alopeciche; in oltre il 90% dei casi è possibile apprezzare un nodulo tiroideo palpabile (BOX 1) (Figura A, B). In rari casi il nodulo può raggiungere notevoli dimensioni e spesso si tratta di carcinomi (Figura 5). I pazienti ipertiroidei sono soggetti particolarmente stressabili, pertanto la visita clinica e le successive manualità dovrebbero essere eseguite con particolare cautela (ad esempio evitando lunghe attese, movimenti bruschi e repentini, eccessive manipolazioni) onde evitare scompenso cardio-circolatorio (Figura 6).



Figura 6 – Gatto ipertiroideo che al momento della visita si presenta particolarmente stressato ed inizia a respirare a bocca aperta

Box 1 – Palpazione della tiroide

Solo occasionalmente la presenza del gozzo (neoformazione) è macroscopicamente visibile, mentre nella maggioranza dei casi è invece necessaria la palpazione della ghiandola. La palpazione della tiroide è una manualità che prevede una tecnica di facile esecuzione che dovrebbe essere considerata come parte integrante della visita clinica per tutti i gatti soprattutto se al di sopra degli otto anni di età. La manualità migliore per l'esplorazione della tiroide nel gatto prevede il posizionamento dell'animale con gli arti anteriori dritti ed il collo in linea con gli arti e tenuto leggermente esteso (**Figura A**). In questa posizione tenendo la testa con una mano, con l'altra si percorrerà delicatamente la trachea con pollice ed indice apposti tra di loro dall'alto verso il basso e viceversa, a partire dalla laringe fino all'ingresso del torace all'altezza del manubrio (**Figura A e B, Video 1**). In condizioni di normalità la ghiandola tiroidea non è esplorabile attraverso la palpazione; nel caso in cui siano presenti dei noduli questi si avvertiranno come delle strutture relativamente mobili delle dimensioni variabili da 1 mm a 3 cm che scivoleranno attraverso le dita. Circa nel 90% dei gatti ipertiroidei sono presenti uno o più noduli palpabili che interessano uno o più spesso entrambi i lobi della ghiandola. Da recenti studi si è visto che maggiori sono le dimensioni del/dei nodulo/i e più elevata è l'età del gatto maggiore è la probabilità che il soggetto sia effettivamente ipertiroideo; la presenza di un nodulo o anche di una massa nella regione cervicale possono tuttavia presentarsi anche in una percentuale elevata di gatti eutiroidei o in gatti con altre patologie non tiroidee (iperplasia paratiroidea, neoplasia); per questo motivo è sempre indispensabile confermare il sospetto diagnostico attraverso l'ausilio degli esami di laboratorio o della scintigrafia.

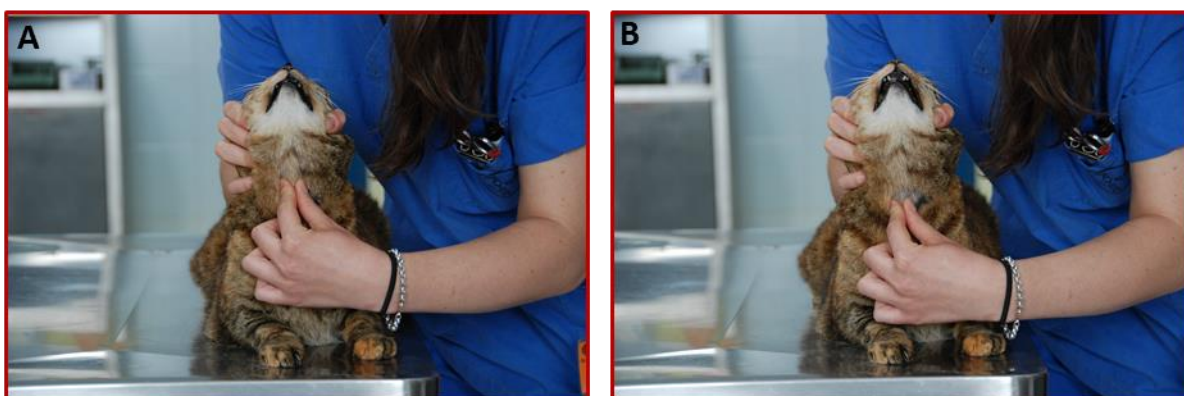


Figura A e B - Manualità per una corretta palpazione della tiroide. La testa deve essere estesa e il gatto deve stare dritto. Con indice e pollice che quasi si toccano si parte dalla laringe (**A**) e si scende lungo la trachea fino all'entrata del petto (**B**). Il nodulo o i noduli tiroidei, se presenti, si possono apprezzare con lo scorrimento delle dita.



Video 1

Manualità per una corretta palpazione della tiroide. La testa deve essere estesa e il gatto deve stare dritto. Con indice e pollice che quasi si toccano si parte dalla laringe e si scende lungo la trachea fino all'entrata del petto. Si può notare un nodulo tiroideo destro che scorre al di sotto delle dita.

È importante visitare il paziente in un ambiente tranquillo e non affollato, parlare con tono di voce basso e tranquillo e rispettare alcuni accorgimenti: aspettare che il gatto esca volontariamente dal trasportino o incoraggiarlo delicatamente, visitare il paziente in una cesta o su una coperta prediligendo un approccio laterale o ponendosi dietro ad esso e interrompere la visita qualora mostri segni di forte stress.

Tachipnea e respiro a bocca aperta non sono riscontri infrequenti durante la visita di un gatto ipertiroidico e possono essere esacerbati dallo stress dovuto al viaggio o alla visita clinica. Non tutti i gatti con alterazioni dei caratteri del respiro hanno un'insufficienza cardiaca congestizia o patologie respiratorie sottostanti, ma bisogna considerarle tra le diagnosi differenziali di distress respiratorio e, se necessario, procedere con ulteriori accertamenti diagnostici.^{33,34} Iperventilazione e dispnea sono sintomi comuni anche nelle persone con ipertiroidismo e sono conseguenti alla debolezza dei muscoli respiratori, alla minore compliance polmonare, all'aumento della risposta ventilatoria all'ipossia e all'ipercapnia e alla presenza di concomitanti patologie cardiache.³⁵ Anche nel gatto le cause di tachipnea e panting sembrano essere multifattoriali.

20

All'auscultazione è frequente evidenziare la presenza di tachicardia sinusale, soffio sistolico, ritmo di galoppo e, meno frequentemente, aritmie. La tachicardia (≥ 220 bpm), presente nel 30% dei gatti ipertiroidici, è dovuta ad un aumento del tono simpatico e ad una diminuzione del parasimpatico.³⁶ Il T_3 ha un effetto diretto sulla muscolatura liscia arteriolare con conseguente riduzione delle resistenze periferiche. La diminuzione del volume circolante porta all'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) e quindi a un'espansione del volume ematico. Gli ormoni tiroidei attivano, inoltre, geni che codificano per le proteine strutturali e regolatorie cardiache con conseguente aumento della contrattilità miocardica.

I risultati di tali effetti sono evidenti all'esame ecocardiografico che comunemente riscontra la presenza di una cardiomiopatia ipertrofica che può portare ad insufficienza cardiaca e tromboembolismo aortico. A differenza di quanto riportato in precedenza³⁷, studi più recenti hanno riscontrato che solo una bassa percentuale (5-15%) di gatti ipertiroidici presenta, alla diagnosi, una lieve-moderata ipertensione.³⁸ Nonostante l'ipertiroidismo sia associato ad un aumento dell'output cardiaco, le resistenze vascolari periferiche diminuiscono notevolmente pertanto l'aumento della pressione sistemica è di solito modesto. L'ipertensione può svilupparsi dopo diversi mesi di terapia come riscontrato in due studi nei quali un 20-25% di

gatti ipertiroidei normotesi alla diagnosi aveva sviluppato ipertensione in corso di terapia.^{39,40} Non è chiaro se lo sviluppo di ipertensione sia associato ad un declino della funzionalità renale una volta raggiunto l'eutiroidismo; i risultati di uno studio del 2013 mostrano come lo sviluppo di ipertensione post-trattamento non sia limitato ai gatti diventati iperazotemici in seguito alla terapia, inoltre non sono state riscontrate delle differenze significative nell'attivazione del RAAS tra i gatti ipertiroidei che avevano sviluppato ipertensione e quelli che erano rimasti normotesi in corso di terapia.⁴⁰

In circa il 10% dei casi è possibile riscontrare quello che viene chiamato "ipertiroidismo apatico" dove polifagia e iperattività sono sostituite da anoressia e depressione, permane invece il dimagrimento.

I sintomi ed i reperti clinici principali descritti in letteratura sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1 – Sintomi e reperti clinici principali dell'ipertiroidismo felino^{8,28,36}			
Sintomo o reperto clinico	Peterson et al.(1983) 131 gatti	Broussard et al.(1995) 202 gatti	Peterson et al. (2016) 462 gatti
Dimagrimento	128 (98%)	177 (87%)	425 (92%)
Polifagia	106 (81%)	99 (49%)	253 (55%)
Iperattività	99 (76%)	63 (31%)	190 (41%)
Pu/Pd	78 (60%)	73 (36%)	152 (33%)
Vomito	72 (55%)	89 (44%)	216 (47%)
Diarrea	43 (33%)	30 (15%)	95 (21%)
Aumento del volume fecale	41 (31%)	17 (8%)	
Anoressia/Inappetenza	34 (26%)	14 (7%)	
Debolezza muscolare/Letargia	33 (25%)	24 (12%)	60 (13%)
Dispnea	14 (11%)	20 (10%)	
Alopecia/Alterazioni del pelo	9 (7%)	6 (3%)	
Tachicardia	87 (66%)	85 (42%)	145 (31%)
Soffio cardiaco	70 (53%)	109 (54%)	134 (29%)
Nodulo tiroideo palpabile	118 (90%)	167 (83%)	450 (97%)

PROCEDURE DIAGNOSTICHE

Trattandosi di una patologia geriatrica, nei pazienti ipertiroidei è frequente la presenza di patologie concomitanti che possono complicarne il quadro clinico. Non esistono segni clinici patognomonic per l'ipertiroidismo, per tanto la diagnosi definitiva richiede la dimostrazione di un persistente aumento degli ormoni tiroidei in circolo. Il diagnostico differenziale di gatti con segni clinici compatibili con ipertiroidismo dovrebbe includere: diabete mellito,

malassorbimento gastrointestinale o maldigestione (es. insufficienza pancreatica esocrina), neoplasie (es. linfoma del tratto gastroenterico), malattia renale cronica (CKD, *chronic kidney disease*), parassiti, gravi errori nutrizionali.^{29,41}

Test di screening

Gli esami emato-biochimici di base e l'esame delle urine sono utili soprattutto per escludere altre patologie e in parte permettono di supportare la diagnosi.

L'esame emocromocitometrico fornisce solitamente informazioni aspecifiche. È frequente il riscontro di un leucogramma da stress mentre è raro il riscontro di anemia. In alcuni casi è possibile osservare una lieve-moderata eritrocitosi dovuta alla maggiore produzione di eritropoietina.⁴² La presenza di corpi di Heinz è più frequente nei gatti ipertiroidi rispetto a gatti sani e, probabilmente, è conseguente alla deplezione di sostanze antiossidanti e ad un eccessivo catabolismo di grassi e proteine.⁴³

Nel 90% dei gatti ipertiroidi, il profilo biochimico rileva un lieve-moderato aumento di almeno uno degli enzimi epatici (alanina aminotransferasi ALT, aspartato aminotransferasi AST, fosfatasi alcalina ALP, lattato deidrogenasi LDH) e nel 75% un aumento dell'ALT e della ALP. Un aumento marcato degli enzimi epatici potrebbe essere suggestivo di danno d'organo, tuttavia molti gatti ipertiroidi anche con un grave aumento di attività sierica degli enzimi epatici hanno una funzionalità epatica normale.⁴⁴ Ulteriori approfondimenti per patologie epatobiliari trovano una giustificazione solamente in caso di mancato miglioramento dei valori epatici nei primi due mesi di terapia o qualora il paziente risulti itterico o si presenti disoressico/anoressico.⁴⁵

In alcuni casi si può osservare iperglicemia da stress e, nel 17-50% dei casi, una diminuzione delle fruttosamine presumibilmente per un aumentato proteocatabolismo.^{46,47} Un recente studio ha evidenziato che la concentrazione delle fruttosamine è significativamente più bassa nei gatti diabetici con ipertiroidismo non controllato, rispetto a gatti diabetici eutiroidei.⁴⁸

Iperfosfatemia, ipocalcemia ionica e ipocolesterolemia possono essere inoltre riscontrate nei gatti ipertiroidi.

All'esame delle urine il peso specifico urinario è estremamente variabile con un intervallo che può oscillare da 1009 a 1050.⁸ Si osserva frequentemente (75-80%) la presenza di proteinuria,

solitamente di lieve entità, la cui gravità solitamente si riduce con il trattamento dell'ipertiroidismo.^{38,44,49,50} Il meccanismo alla base della proteinuria nei gatti ipertiroidei non è stato del tutto chiarito. Iperensione e iperfiltrazione glomerulare, cambiamenti nella gestione delle proteine tubulari e modificazioni strutturali della barriera glomerulare potrebbero avere un ruolo nella patogenesi.⁵⁰ La presenza di proteinuria pretrattamento è correlata ad una riduzione dei tempi di sopravvivenza, ma non allo sviluppo di iperazotemia.³⁸ Le infezioni del tratto urinario (UTI, *urinary tract infection*) sono relativamente frequenti nei gatti con ipertiroidismo; in uno studio il 12% dei gatti ipertiroidei aveva un esame colturale positivo, ma solo in 2 di questi gatti era presente sintomatologia specifica.⁵⁰ La presenza di UTI pertanto non può essere esclusa sulla base dell'assenza di sintomi clinici e di un esame del sedimento urinario.

Test di funzionalità tiroidea

La diagnosi di ipertiroidismo è confermata con il riscontro di un aumento delle concentrazioni circolanti di ormoni tiroidei.

Nella maggior parte dei gatti ipertiroidei si assiste ad un aumento delle concentrazioni sieriche di T₄, free T₄ (fT₄) e T₃. La diagnosi di ipertiroidismo viene eseguita mediante valutazione delle concentrazioni di T₄ totale poiché la misurazione del T₃ si associa ad un 25-30% di falsi negativi. Nonostante ciò la patologia non può essere esclusa dal solo ritrovamento di valori di T₄ entro i limiti di riferimento, soprattutto nei gatti in cui la sintomatologia clinica e la presenza di un nodulo tiroideo risultino evidenti. In questi casi è consigliato ripetere le misurazioni del T₄ dopo 2-4 settimane o eventualmente effettuare un test dinamico di funzionalità tiroidea (test di soppressione con T₃, ad oggi test utilizzato raramente). Il free T₄ presenta una sensibilità leggermente superiore rispetto al T₄ totale, tuttavia pecca di specificità e spesso risulta elevato in gatti eutiroidei con patologie concomitanti.^{51,52}

In gatti anziani con sintomi clinici compatibili con l'ipertiroidismo, confermare la diagnosi è abbastanza semplice, infatti, più del 90% presenta delle concentrazioni sieriche di T₄ molto al di sopra del range di riferimento.^{8,42,51,52,53} La misurazione del T₄ è relativamente economica e facilmente attuabile, per questi motivi è il test di scelta per lo screening di gatti con sospetto ipertiroidismo. Sono disponibili diverse metodiche per la misurazione del T₄ nessuna delle quali ha una sensibilità e specificità del 100% (Tabella 2).⁵⁴

Tabella 2 – Metodiche per la misurazione del T₄

Metodica	Caratteristiche
DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO (RIA)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Per lungo tempo considerato il gold standard ▪ Norme che regolamento la radioattività hanno portato alla ricerca di metodiche alternative ▪ Non automatizzata e costosa ▪ Usata prevalentemente nei centri di ricerca
CHEMILUMINESCENZA (CEIAS)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Utilizza gli stessi anticorpi della RIA ▪ Non misura gli isotopi radioattivi legati all'ormone ma usa un fotomoltiplicatore che conta le emissioni luminose ▪ Validata per l'utilizzo sul siero felino ▪ > automatismo vs RIA ▪ Immulite= ≠ tecnologie con ≠ caratteristiche e performance ▪ Risultati molto simili a RIA
KIT ELISA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Economico ▪ Risultato immediato ▪ Meno preciso e affidabile se comparato con RIA; tende a sovrastimare il T₄, valori discordanti in + del 56% dei casi che hanno portato a decisioni cliniche errate ▪ Non accurato per la misurazione del T₄ nel gatto
DOSAGGIO IMMUNOENZIMATICO (EIA)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Non usa reagenti radioattivi ▪ Validato per l'uso nel cane e nel gatto ▪ Completamente automatizzato, i risultati sono disponibili in breve tempo ▪ Non necessita di strumentazione separata → può essere effettuato assieme alle analisi chimiche di routine ▪ Costi più contenuti ▪ I valori mostrano una buona correlazione se comparati con RIA ▪ Tende a sottostimare sia per valori bassi che alti di T₄ se comparato con CEIA → EIA= elevata frequenza di falsi negativi e positivi che possono portare a decisioni cliniche errate in gatti con valori borderline (sia alti che bassi) di T₄
ALTRE METODICHE "UMANE"	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Per la maggiore parte non validate per l'utilizzo nel cane e nel gatto ▪ Mancanza di sensibilità e performance scarse soprattutto per valori bassi di T₄ ▪ Non raccomandate
LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sempre più utilizzata nell'uomo per la quantificazione degli ormoni tiroidei poiché ha maggiore specificità, accuratezza e precisione rispetto alle metodiche immunologiche. Non necessita inoltre dell'utilizzo di radioisotopi ▪ Promettente utilizzo in medicina veterinaria, necessari studi clinici per raccomandarle il routinario utilizzo

Di seguito vengono riportate le principali *performances* diagnostiche nelle misurazioni degli ormoni connessi alla funzionalità tiroidea.

T₄

- Sensibilità 91%; specificità 100%.⁵¹ Uno studio effettuato da Peterson e colleghi (2001) su 917 gatti ipertiroidei, 172 gatti clinicamente sani e 221 gatti con patologie non tiroidee ha evidenziato come nessun gatto con ipertiroidismo avesse concentrazioni T₄ al di sotto del range di normalità e nessun gatto con patologie non tiroidee avesse concentrazioni elevate di T₄. Circa il 9% di gatti ipertiroidei aveva tuttavia concentrazioni di T₄ sierico all'interno dei range di riferimento.⁵¹
- Ottimo test di screening.
- Gatti con ipertiroidismo in fase iniziale o con patologie concomitanti possono avere un T₄ nei range. La presenza di comorbidità è associata ad una diminuzione del T₄ sia in gatti eutiroidei che ipertiroidei. Le principali patologie concomitanti associate ad una diminuzione del T₄ sono il diabete mellito, le epatopatie, la CKD, le patologie gastrointestinali e le neoplasie. La gravità della patologia ha un effetto maggiore sul T₄ rispetto alla tipologia della patologia.^{51,52,55,56,57}
- Possibili fluttuazioni.
- Poche informazioni riguardo all'influenza di età e trattamenti farmacologici. Si suppone che molti dei farmaci in grado di influenzare i livelli di T₄ nel cane possano avere un'influenza simile nel gatto, ma non sono presenti studi che dimostrino questa teoria.

fT₄

- Rappresenta la forma biologicamente attiva del T₄ (1% del T₄ non legato a carrier).
- Gold standard per la misurazione: equilibrio dialitico, metodica lunga e costosa (centri di ricerca). Prestare attenzione alle performance delle altre metodiche.
- Elevata sensibilità, ma scarsa specificità: il 6-31% dei gatti eutiroidei con patologie concomitanti hanno un fT₄ elevato. Facendo sempre riferimento allo studio di Peterson e colleghi (2001), il 98,5% dei gatti ipertiroidei aveva una concentrazione elevata di fT₄, conferendo a tale parametro una sensibilità diagnostica superiore rispetto al T₄ e al T₃. Dall'altra parte, i valori di fT₄ di alcuni gatti con patologie non tiroidee si trovavano nel range considerato diagnostico per l'ipertiroidismo, determinando quindi dei risultati falsi positivi.⁵¹ Non usare quindi come unico parametro di valutazione.

- Può risultare utile nei gatti con un T₄ nei range nei quali si sospetta l'ipertiroidismo.

T₃

- Deriva dal metabolismo periferico del T₄; biologicamente attivo.
- Scarsa sensibilità: 25-30% di falsi negativi.⁵¹
- Poco utilizzato.

TSH

- La metodica per la misurazione del cTSH (TSH canino) è stata validata per l'utilizzo anche nel gatto.^{14,57,58} Nell'uomo la misurazione del TSH viene eseguita di routine come test di prima scelta per valutare la funzionalità tiroidea e rappresenta il migliore test di screening (se scelto come unico parametro) per escludere l'ipertiroidismo subclinico.⁵⁹ Uno studio ha valutato l'impiego del TSH come test diagnostico per l'ipertiroidismo felino; in questo studio il 98% dei gatti ipertiroidei aveva concentrazioni sieriche di TSH al di sotto del limite di quantificazione (<0,03 ng/mL), tuttavia il cTSH non era rilevabile anche nel 30% dei gatti anziani eutiroidei.⁵⁸ Emerge quindi che il principale limite di questa metodica sia la bassa sensibilità, non in grado di distinguere tra concentrazioni normali-basse e indosabili. Con una metodica sensibile, il rilevamento di concentrazioni sieriche misurabili di cTSH permetterebbe di escludere l'ipertiroidismo nei casi equivoci, soprattutto in riferimento a gatti con ipertiroidismo live-moderato e a gatti eutiroidei malati.
- Associare alla misurazione del cTSH, la valutazione di T₄ e fT₄ aumenta la specificità del test.^{14,57,58} Un T₄ nel terzo superiore del range associato ad un fT₄ elevato e a un TSH soppresso è compatibile con ipertiroidismo in fase iniziale.⁵⁸

Test dinamici

- Valutano la funzionalità tiroidea in seguito ad una stimolazione o soppressione. Non sono di uso comune, ma possono essere utili per arrivare alla diagnosi nei casi in cui la clinica sia in contrasto con la misurazione del T₄. Possono essere d'aiuto quando i valori di T₄ rimangono normali anche a distanza di tempo, quando la concentrazione di fT₄ è equivoca e quando non è possibile effettuare la scintigrafia.
- Test di soppressione con T₃; Test di stimolazione con TRH.

Scintigrafia tiroidea

Consiste nella somministrazione per via EV o SC di radioisotopi ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) a cui segue il rilevamento, dopo 20-60 minuti, della distribuzione e dell'intensità del tracciante nei vari tessuti. Nei gatti ipertiroidei si assiste ad una più rapida e ingente captazione del tracciante da parte della tiroide (Figura 7); l'intensità è inoltre correlata positivamente alla concentrazione di T_4 .⁹ Questa tecnica di imaging permette di stimare il grado di coinvolgimento dei lobi tiroidei e di evidenziare l'eventuale presenza di interessamento bilaterale simmetrico (Figura 8), bilaterale asimmetrico (Figura 9) tessuto tiroideo ectopico iperfunzionante o di metastasi (Figura 10) distanti in caso di carcinoma tiroideo.⁹



Figura 7 - Scintigrafia con tecnezio-99m in gatto ipertiroideo. Si noti un nodulo tiroideo monolaterale di moderate dimensioni. Immagine gentilmente fornita dal Dr Mark Peterson



Figura 9 - Scintigrafia con tecnezio-99m in gatto ipertiroideo. Si noti l'interessamento asimmetrico di entrambi i lobi tiroidei. Immagine gentilmente fornita dal Dr Mark Peterson



Figura 8 - Scintigrafia con tecnezio-99m in gatto ipertiroideo. Si noti l'interessamento simmetrico di entrambi i lobi tiroidei. Immagine gentilmente fornita dal Dr Mark Peterson



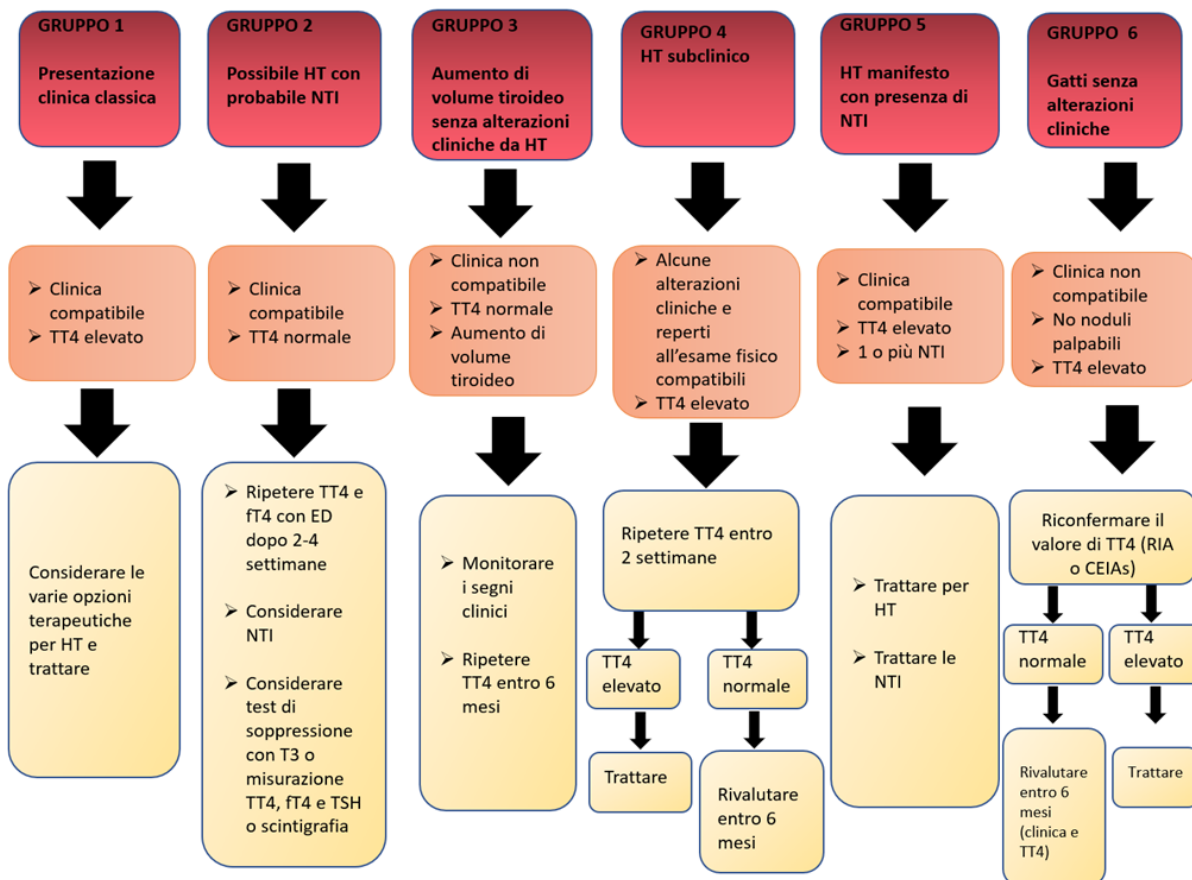
Figura 10 - Scintigrafia con tecnezio-99m in gatto ipertiroideo. Si notino i noduli multifocali legati alla presenza di un carcinoma tiroideo. Immagine gentilmente fornita dal Dr Mark Peterson

Uno studio effettuato su 2096 gatti ipertiroidi sottoposti a scintigrafia ha evidenziato la presenza di una patologia unilaterale nel 31,7%, bilaterale asimmetrica nel 50,6%, bilaterale simmetrica nel 12,3% e multifocale nel 3,9% dei soggetti. La presenza di tessuto tiroideo ectopico è stata riscontrata nel 3,9% dei gatti mentre la presenza di un carcinoma tiroideo è stata sospettata nell'1,7% dei casi. Nella maggiore parte dei gatti si assiste quindi alla presenza di noduli tiroidei uni o bilaterali, mentre un quadro multifocale si può sviluppare nei rari casi di tessuto tiroideo ectopico o carcinoma.⁶⁰

APPROCCIO DIAGNOSTICO

Nelle linee guida per il trattamento dell'ipertiroidismo felino, gli autori propongono un protocollo diagnostico in base al quadro laboratoristico di partenza. I casi vengono suddivisi in sei gruppi in base ai dati anamnestici, ai reperti dell'esame fisico diretto e a un minimo database iniziale (Tabella 3).⁴¹

Tabella 3 – Algoritmo per la diagnosi dell'ipertiroidismo felino



*Modificato da Norsworthy GD, Carney HC and Ward CR.
2016 AAFP Guidelines for the management of feline hyperthyroidism.
Journal of Feline Medicine and Surgery 18: 400-416, 2016.
HT= ipertiroidismo, NTI=soggetto eutiroideo con patologie non tiroidee.*

DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

Ecocardiografia

Di comune riscontro all'esame ecocardiografico di gatti ipertiroidei è la presenza della cardiomiopatia ipertrofica che si evidenzia con ipertrofia del ventricolo sinistro, dilatazione di atrio e ventricolo sinistro e ipertrofia del setto interventricolare.⁶¹ Frequentemente si riscontra l'aumento della frazione di accorciamento, conseguente all'ipercontrattilità miocardica.

Nei casi più avanzati la cardiomiopatia ipertrofica può portare ad insufficienza cardiaca e tromboembolismo aortico.

Radiografia

Più della metà dei gatti ipertiroidei mostra segni di cardiomegalia del settore sinistro che si associano a versamento pleurico ed edema polmonare in caso di insufficienza cardiaca.

Ecografia tiroidea

L'ecografia della regione cervicale può essere usata per valutare la ghiandola tiroidea e fare una stima del suo volume. I lobi tiroidei di gatti sani appaiono come strutture sottili, di forma fusiforme, moderatamente e uniformemente ecogeni situati medialmente alle arterie carotidi comuni e circondati da una sottile fascia iperecogena.²⁹ Normalmente ogni lobo tiroideo è lungo dai 15 ai 25 mm con un volume calcolato di 40-140 mm³ e l'ecogenicità del parenchima varia da lieve a moderata se comparata con il tessuto circostante. I lobi tiroidei dei gatti con ipertiroidismo sono solitamente aumentati di dimensioni in modo uniforme e meno ecogeni rispetto ai lobi tiroidei normali. In un numero non esiguo di gatti ipertiroidei possono essere identificate delle strutture cistiche all'interno della tiroide. L'ecografia tiroidea e la scintigrafia sono concordi nell'85% dei casi nel differenziare i lobi tiroidei normali da quelli patologici.⁶² L'ecografia tiroidea rimane tuttavia una tecnica operatore dipendente, non è in grado di identificare la presenza di tessuto tiroideo ectopico o di metastasi a distanza in caso di carcinoma tiroideo e non fornisce informazioni sull'attività biologica o sulla malignità delle lesioni. Anche la citologia tiroidea, che può essere effettuata per via ecoguidata, non è accurata per differenziare le patologie tiroidee benigne da quelle maligne e non viene pertanto solitamente consigliata.

BIBLIOGRAFIA

1. Peterson ME, Johnson JG and Andrews LK. Spontaneous hyperthyroidism in the cat. Proceeding of the American College of Veterinary Internal Medicine; Seattle, USA; 1979, p108.
2. Holzworth J, Theran P, Carpenter JL, *et al.* Hyperthyroidism in the cat: ten cases. Journal of the American Veterinary Medical Association 176:345-353, 1980.
3. Peterson ME. Hyperthyroidism in cats: what's causing this epidemic of thyroid disease and can we prevent it?. Journal of Feline Medicine and Surgery 14:804-818, 2012.
4. Wakeling J, Melian C, Font A, *et al.* Evidence for differing incidences of feline hyperthyroidism in London UK and Spain. Proceeding of the 15th European College of Veterinary Internal Medicine-Companion Animals; Glasgow; 2005, Sept 1-3, p 220.
5. De Wet CS, Mooney CT, Thompson PN, *et al.* Prevalence of and risk factors for feline hyperthyroidism in Hong Kong. Journal of Feline Medicine and Surgery 11:315-321, 2009.
6. Gerber H, Peter H, Studer H, *et al.* Autonomy of growth of and iodine metabolism of hyperthyroid feline goiters transplanted into nude mice. Journal of Clinical Investigation 80:491-498, 1987.
7. Hammer KB, Holt DE and Ward CR. Altered suppression of G proteins in thyroid gland adenomas obtained from hyperthyroid cats. American Journal of Veterinary Research 61:874-879, 2000.
8. Peterson ME, Kintzer PP, Cavanagh PG, *et al.* Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. Journal of the American Veterinary Medical Association 183:103-110, 1983.
9. Peterson ME and Broome MR. Thyroid scintigraphy findings in 2096 cats with hyperthyroidism. Veterinary Radiology & Ultrasound 56:84-95, 2015.
10. Turrel JM, Feldman EC, Nelson RW, *et al.* Thyroid carcinoma causing hyperthyroidism in cats: 14 cases (1981-1986). Journal of the American Veterinary Medical Association 193:359-364, 1988.
11. Hibbert A, Gruffydd-Jones T, Barrett EL, *et al.* Feline thyroid carcinoma: diagnosis and response to high-dose radioactive iodine treatment. Journal of Feline Medicine and Surgery 11:116-124, 2009.
12. Naan EC, Kirpensteijn J, Kooistra HS, *et al.* Result of thyroidectomy in 101 cats with hyperthyroidism. Veterinary Surgery 35:287-293, 2006.
13. Peterson ME and Broome MR. Hyperthyroid cats on long-term medical treatment show a progressive increase in the prevalence of large thyroid tumors, intrathoracic thyroid masses, and suspected thyroid carcinoma. Proceedings of the 22nd Congress of the European College of Veterinary Internal Medicine-Companion Animals, 2012, p 224.
14. Wakeling J, Elliot J and Syme H. Evaluation of predictors for the diagnosis of hyperthyroidism in cats. Journal of Veterinary Internal Medicine 25:1057-1065, 2011.
15. Wakeling J, Everard A, Brodbelt D, *et al.* Risk factors for feline hyperthyroidism in the UK. Journal of Small Animal Practice 50:406-414, 2009.

16. Calsolaro V, Pasquetti G, Niccolai F, *et al.* Thyroid disrupting chemicals. *International Journal of Molecular Sciences* 18:2583, 2017.
17. Silva MMD, Xavier LLF, Gonçalves CFL, *et al.* Bisphenol A increases hydrogenperoxide generation by thyrocytes both in vivo and in vitro. *Endocrine Connections* 7:1196-1207, 2018.
18. Noonan GO, Ackerman LK and Begley TH. Concentration of bisphenol A in highly consumed canned foods on the US market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:7178-7185, 2011.
19. Edinboro CH, Scott-Moncrieff JC, Janovitz E, *et al.* Epidemiologic study of relationships between consumption of commercial canned food and risk of hyperthyroidism cats. *Journal of American Veterinary Medical Association* 224:879-886, 2004.
20. Norrgran J, Jones B, Bignert A, *et al.* Higher PBDE serum concentrations may be associated with feline hyperthyroidism in Swedish cats. *Environmental Science & Technology* 49:5107-5114, 2015.
21. Guo W, Gardner S, Yen S, *et al.* Temporal changes of PBDE levels in California house cats and a link to cat hyperthyroidism. *Environmental Science & Technology* 50:1510-1518, 2016.
22. Guo W, Park JS, Wang Y, *et al.* High polybrominated diphenyl ether levels in California house cats: house dust a primary source?. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31:301-306, 2012.
23. Dye JA, Venier M, Zhu L, *et al.* Elevated PBDE levels in pet cats: sentinels for humans?. *Environmental Science & Technology* 41:6350-6356, 2007.
24. Scarlett JM, Moise JN and Rayl J. Feline hyperthyroidism: goitrogens descriptive and case-control study. *Preventive Veterinary Medicine* 6:295-309, 1998.
25. Kass PH, Peterson ME, Levy J, *et al.* Evaluation of environmental, nutritional, and host factors in cats with hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13:323-329, 1999.
26. Olczak J, Jones BR, Pfeiffer DU, *et al.* Multivariate analysis of risk factors for feline hyperthyroidism in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 53:53-58, 2004.
27. Gordon JM, Ehrhart EJ, Sisson DD, *et al.* Juvenile hyperthyroidism in cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 39:67-71, 2003.
28. Peterson ME, Castellano CA and Rishniw M. Evaluation of body weight, body condition, and muscle condition in cats with hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30:1780-1789, 2016.
29. Scott-Moncrieff JC. Feline hyperthyroidism. In: Feldman EC, Nelson RW, Reusch CE, Scott-Moncrieff JC, Behrend EN (eds) *Canine and Feline Endocrinology*. 4th ed. St. Luis: Elsevier Inc, 2015, pp. 136-195.
30. Schlesinger DP, Rubin SI, Papich MG, *et al.* Use of breath hydrogen measurement to evaluate orocecal transit time in cats before and after treatment for hyperthyroidism. *Canadian Journal of Veterinary Research* 57:88-94, 1993.
31. Bradley SE, Stephan F, Coelho JB, *et al.* The thyroid and the kidney. *Kidney International* 6:346-365, 1974.
32. Langstom CE and Reine NJ. Hyperthyroidism and the Kidney. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 21:17-21, 2006.
33. Mooney CT and Peterson ME. Feline hyperthyroidism. In: Mooney CT and Peterson ME (eds). *BSAVA Manual of canine and feline endocrinology*. 4th ed. USA:Wiley, 2012, pp. 92-110.
- 34.

35. Syme HM. Cardiovascular and renal manifestations of hyperthyroidism. *Veterinary Clinics Small Animal Practice* 37:723-743, 2007.
36. Burch HB. Overview of the clinical manifestations of hyperthyroidism. In: Braverman LE, Cooper DS (eds). *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. 10th ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2013, p. 434.
37. Sun ZQ, Ojamaa K, Nakamura TY, *et al*. Thyroid hormone increases pacemaker activity in rat neonatal myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33:811-824, 2001.
38. Kobayashi DL, Peterson ME, Graves TK, *et al*. Hypertension in cats with chronic renal failure or hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4:58-62, 1990.
39. Williams TL, Peak KJ, Brodbelt D, *et al*. Survival and the development of azotemia after treatment of hyperthyroid cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24:863-869, 2010.
40. Morrow LD, Adams VJ, Elliott J, *et al*. Hypertension in hyperthyroid cats: prevalence, incidence and predictors of its development. *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine*; Montreal, Canada; 2009, June 3 to 6 pp. 699.
41. Williams TL, Elliott J and Syme HM. Renin-angiotensin-aldosterone system activity in hyperthyroid cats with and without concurrent hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:522-529, 2013.
42. Carney HC, Ward CR, Bailey SJ, *et al*. 2016 AAFP Guidelines for the management of feline hyperthyroidism. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18:400-416, 2016.
43. Broussard JD, Peterson ME and Fox PR. Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 206:302-305, 1995.
44. Branter E, Drescher N, Padilla M, *et al*. Antioxidant status in hyperthyroid cats before and after radioiodine treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26:582-58, 2012.
45. Berent AC, Drobatz KJ, Ziemer L, *et al*. Liver function in cats with hyperthyroidism before and after 131I therapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21:1217-1223, 2007.
46. Daminet S, Kooistra HS, Fracassi F, *et al*. Best practice for the pharmacological management of hyperthyroid cats with antithyroid drugs. *Journal of Small Animal Practice* 55:4-13, 2014.
47. Graham PA, Mooney CT and Murray M. Serum fructosamine concentrations in hyperthyroid cats. *Research in Veterinary Science* 67:171-175, 1999.
48. Reusch CE and Tomsa K. Serum fructosamine concentration in cats with overt hyperthyroidism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 215:1297-1300, 1999.
49. Gal A, Trusiano B, French A, *et al*. Serum fructosamine concentration in uncontrolled hyperthyroid diabetic cats is within the population reference interval. *Veterinary Science* 4:17, 2017.
50. van Hoek I, Lefebvre HP, Peremans K, *et al*. Short- and long-term follow-up of glomerular and tubular renal markers of kidney function in hyperthyroid cats after treatment with radioiodine. *Domestic Animal Endocrinology* 36:45-56, 2009.
51. Mayer-Roenne B, Goldstein RE and Erb HN. Urinary tract infection in cats with hyperthyroidism, diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 9:124-132, 2007.

52. Peterson ME, Melian C and Nicholas R. Measurement of serum concentrations of free thyroxine, total thyroxine, and total triiodothyronine in cats with hyperthyroidism and cats with non-thyroidal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218:529-536, 2001.
53. Peterson ME. Diagnostic tests for hyperthyroidism in cats. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 21:2-9, 2006.
54. Thoday KL and Mooney CT. Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. *Veterinary Research* 131:257-264, 1992.
55. Peterson ME. More than just T4. Diagnostic testing for hyperthyroidism in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15:765-777, 2013.
56. McLoughlin MA. Influence of systemic nonthyroidal illness in serum concentrations of thyroxine in hyperthyroid cats. *Journal of The American Animal Hospital Association* 29: 227, 1993.
57. Tomsa K, Glaus TM, Kacel GM, *et al.* Thyrotropin-releasing hormone stimulation test to assess thyroid function in severely sick cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15:89-93, 2001.
58. Wakeling J, Moore K, Elliott J, *et al.* Diagnosis of hyperthyroidism in cats with mild chronic kidney disease. *Journal of Small Animal Practice* 49:287-294, 2008.
59. Peterson ME, Guterl JN, Nicholas R, *et al.* Evaluation of serum thyroid-stimulating hormone concentration as a diagnostic test for hyperthyroidism in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:1327-1334, 2015.
60. Bahn RS, Burch HB, Cooper DS, *et al.* Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologist. *Thyroid* 21:593-646, 2011.
61. Peterson ME and Broome MR. Thyroid scintigraphy findings in 2096 cats with hyperthyroidism. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 56:84-95, 2015.
62. Bond BR, Fox PR, Peterson ME, *et al.* Echocardiographic findings in 103 cats with hyperthyroidism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192:1546-1549, 1988.
63. Wisner ER, Théon AP, Nyland TG, *et al.* Ultrasonographic examination of the thyroid gland in hyperthyroid cats: comparison to ^{99m}Tc scintigraphy. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 35:53, 1994.

Capitolo 3

La terapia dell'ipertiroidismo felino

*G. Carotenuto, F. Fracassi
Veterinaria 2019; 33(2):83-93*

RIASSUNTO

L'ipertiroidismo nel gatto è una patologia grave che richiede un tempestivo intervento da parte del veterinario. Dopo avere stabilito la diagnosi, l'attenzione va riposta sulla scelta terapeutica da intraprendere. Esistono diverse opzioni per il trattamento dell'ipertiroidismo felino quali: terapia con iodio radioattivo, tiroidectomia, uso di farmaci antitiroidei e una dieta a forte restrizione di iodio. La scelta dipende dalle condizioni del soggetto, dalle disponibilità economiche del proprietario e dalla presenza o meno di centri specializzati per effettuare la radioiodoterapia. L'obiettivo terapeutico consiste nel ripristinare una condizione di eutiroidismo, evitare l'ipotiroidismo e minimizzare gli effetti avversi del trattamento.

ABSTRACT

Feline hyperthyroidism is a life-threatening disease requiring prompt veterinary treatment. After the diagnosis, it is mandatory to choose the appropriate treatment. There are several options for the treatment of feline hyperthyroidism: radioactive iodine, surgical thyroidectomy, use of antithyroid drugs and dietary therapy using an iodine-restricted food. The choice of therapy is based on the clinical conditions of the cat, treatment costs and the presence or specialized centres for the treatment with radioactive iodine. The goal of the therapy is to restore euthyroidism, avoid hypothyroidism and minimize side effects of the treatment.

INTRODUZIONE

L'ipertiroidismo è oggi la più comune endocrinopatia del gatto. Le ripercussioni date dal persistente aumento degli ormoni tiroidei in circolo possono essere gravi e, se non opportunamente trattate, determinare la morte del soggetto. Ad oggi esistono diverse opzioni terapeutiche e possono essere suddivise in terapie potenzialmente curative (radioiodio terapia e tiroidectomia) e terapie non curative (terapia medica con farmaci antitiroidei e dieta a forte restrizione di iodio). Il trattamento con ^{131}I è considerato d'elezione per l'ipertiroidismo felino per via dell'elevata efficacia terapeutica e la relativa assenza di complicazioni;^{1,2} rappresenta inoltre la terapia d'elezione nei rari casi di carcinoma tiroideo. I costi piuttosto sostenuti e la necessità di strutture specializzate sono i principali fattori che ne limitano l'impiego. Nel caso di pazienti geriatrici, con patologie concomitanti (soprattutto patologia renale cronica: chronic kidney disease, CKD) e nei casi in cui il cliente rifiuti la radioterapia o la chirurgia, la somministrazione a lungo termine di farmaci antitiroidei risulta una valida opzione, con un'efficacia terapeutica che supera il 90%.³ Ipertiroidismo e malattia renale cronica sono due problematiche che si incontrano spesso nei pazienti anziani; le raccomandazioni terapeutiche differiscono a seconda dello stadio IRIS, risulta quindi fondamentale determinare la funzionalità renale prima di iniziare la terapia per l'ipertiroidismo. La scelta terapeutica deve quindi tenere conto in primo luogo delle condizioni cliniche del paziente; compliance del proprietario e disponibilità di centri specializzati giocano comunque un ruolo importante. Indipendentemente dal trattamento intrapreso, l'obiettivo terapeutico consiste nel raggiungere lo stato di eutiroidismo, evitare l'ipotiroidismo e ridurre gli effetti avversi garantendo una buona qualità di vita.³

TRATTAMENTO

Le opzioni terapeutiche includono la terapia con iodio radioattivo, la tiroidectomia, l'uso di farmaci antitiroidei e una dieta a forte restrizione di iodio. Vantaggi e svantaggi delle varie opzioni terapeutiche sono riassunti nelle Tabelle 1, 2, 3, 4.

TERAPIA CON IODIO RADIOATTIVO

La terapia con iodio radioattivo è considerata d'elezione per l'ipertiroidismo felino; ciò è legato all'elevata efficacia terapeutica e la relativa assenza di complicazioni; risulta inoltre un'ottima opzione terapeutica nei casi di carcinoma tiroideo.¹ A causa del potenziale

radioattivo della molecola il trattamento può essere eseguito solo in strutture autorizzate, motivo per cui ad oggi il suo impiego è limitato a pochi centri.

Lo ^{131}I viene somministrato sottocute e questo va rapidamente ad accumularsi nella tiroide. Le radiazioni β dello ^{131}I distruggono selettivamente le cellule tiroidee iperfunzionanti risparmiando il tessuto tiroideo normale, le paratiroidi e le altre strutture adiacenti. Il trattamento è sicuro e risulta efficace nel 95% dei casi (Figura 1A e 1B).^{2,4} Gatti con tumori di grandi dimensioni, con segni clinici gravi, elevati valori di T_4 o con carcinoma tiroideo, rappresentano solitamente il 5% dei soggetti che non raggiunge l'eutiroidismo dopo una singola somministrazione di ^{131}I . Il trattamento richiede l'ospedalizzazione e l'isolamento del gatto per un tempo variabile (da 3 giorni a 4 settimane) dopo la somministrazione dello ^{131}I a causa dell'elevata eliminazione di radiazioni attraverso feci e urine. Il target terapeutico consiste nel ripristinare l'eutiroidismo usando la più bassa dose singola di ^{131}I evitando allo stesso tempo lo sviluppo di ipotiroidismo.

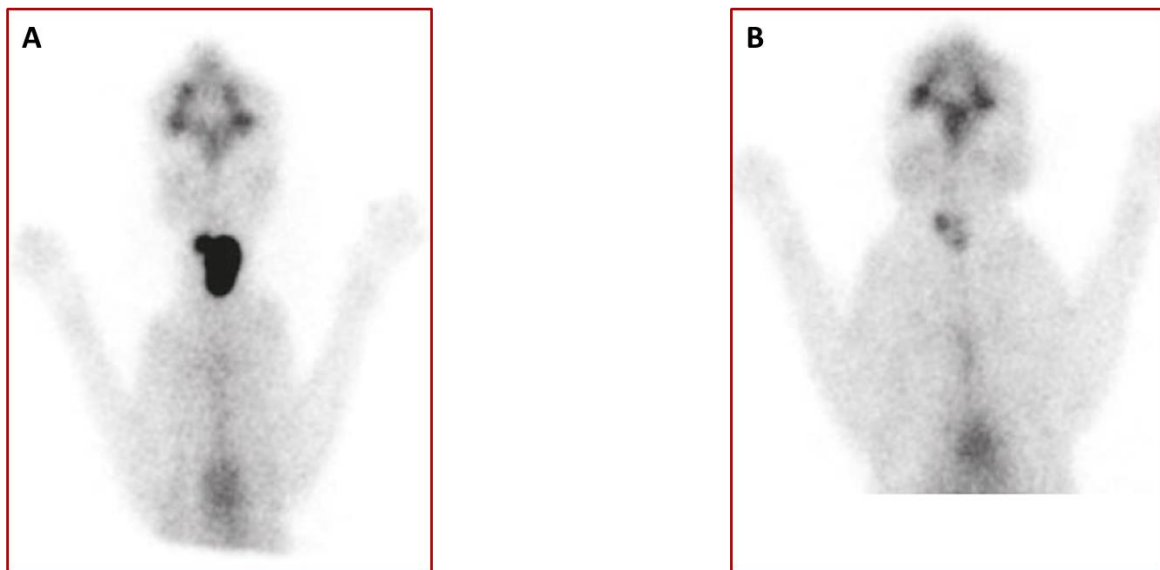


Figura 1 - Immagini scintigrafiche di un gatto ipertiroideo di 16 anni prima e dopo il trattamento con ^{131}I . Prima del trattamento (A) il gatto presentava un T_4 di 140 nmol/L e un TSH <0,03 ng/ml. Si notano noduli "caldi" presenti bilateralmente e asimmetrici. Scintigrafia (B) allo stesso gatto a 6 mesi dalla terapia con ^{131}I . Il T_4 è rientrato nei limiti di normalità (24 nmol/L) con TSH leggermente elevato (0,48 ng/ml). Entrambi i lobi tiroidei sono tornati nei limiti della norma. Immagini cortesemente fornite dal Dr. M. Peterson.

Esistono diversi approcci per determinare la dose esatta di ^{131}I da somministrare ai gatti ipertiroidei. L'approccio più utilizzato è un protocollo a dose fissa, nel quale viene somministrata una dose standard di 4-5 millicurie (mCi; 148-185 megabecquerel [mBq]) di ^{131}I

indipendentemente dalla gravità dell'ipertiroidismo o dalle dimensioni del tumore tiroideo.^{5,6} Meno comunemente vengono utilizzati protocolli individualizzati o dosi personalizzate, nei quali la dose di ¹³¹I può essere bassa (3mCi; 110 mBq), media (4mCi; 150 mBq), o elevata (5mCi; 185 mBq) in base alla gravità della malattia e alle dimensioni del gozzo.¹ Uno studio preliminare suggerisce che anche la dose di 3mCi potrebbe apportare più radioiodio di quanto molti gatti ipertiroidei necessitino e che 2mCi (75 mBq) di ¹³¹I potrebbero essere sufficienti per trattare la maggiore parte dei gatti con ipertiroidismo lieve-moderato.⁷ Il principale svantaggio di un più basso dosaggio di radioiodio consiste nel potenziale fallimento terapeutico. Dall'altra parte, un dosaggio inferiore, ridurrebbe la radioesposizione ai gatti e personale, i costi, i tempi di quarantena e probabilmente diminuirebbe anche l'incidenza di ipotiroidismo iatrogeno. I risultati di uno studio recente hanno confermato che un basso dosaggio di ¹³¹I (2 mCi) risulta sicuro ed efficace per trattare i gatti con ipertiroidismo lieve-moderato; inoltre, i gatti trattati con un basso dosaggio avevano concentrazioni inferiori di creatinina e sviluppavano ipotiroidismo meno frequentemente rispetto ai gatti trattati con la dose standard (4mCi) di ¹³¹I. I gatti trattati con 2mCi di ¹³¹I mostravano raramente la persistenza dell'ipertiroidismo (3,3%), frequenza comparabile a quella dei gatti trattati con i dosaggi convenzionali di radioiodio.⁸

Tabella 1 Caratteristiche della terapia con iodio radioattivo		
Terapia con iodio radioattivo		
Vantaggi	Svantaggi	Controindicazioni
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Curativa nel ≥95% ➤ Efficace in presenza di tessuto ectopico o carcinoma ➤ Nella maggiore parte dei casi sufficiente una singola somministrazione ➤ Effetti avversi gravi molto rari ➤ Minimo rischio di ipotiroidismo permanente ➤ Se trattamento efficace, necessari pochi controlli ➤ Tasso di recidiva 5% 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Irreversibile ➤ Limitata disponibilità di centri specializzati ➤ Necessaria ospedalizzazione da 3 giorni a 4 settimane ➤ Non è possibile visitare il gatto ➤ Nelle 2 settimane dopo la dimissione: il gatto deve rimanere in casa, devono essere adeguatamente smaltite tutte le deiezioni e non è possibile accarezzare il gatto per lunghi periodi ➤ Elevati costi iniziali 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Gatti con concomitante grave insufficienza renale

TERAPIA MEDICA

La terapia medica può essere usata a lungo termine per il trattamento dell'ipertiroidismo o a breve termine prima della radioterapia o della chirurgia.⁹ Nel secondo caso permette di ridurre i rischi di complicazioni (tachiaritmie) durante l'anestesia e di valutare se la concentrazione di T₄ possa essere ridotta in modo sicuro senza causare uno scompenso della funzionalità renale.

Tra i farmaci antitiroidei, quelli più utilizzati sono i composti tiouracilici (metimazolo, carbimazolo e propiltiouracile).

Tabella 2
Caratteristiche della terapia con farmaci antitiroidei

Terapia medica		
Vantaggi	Svantaggi	Controindicazioni
<ul style="list-style-type: none">➤ Reversibilità (no rischi di ipotiroidismo permanente, reversibile in caso di peggioramento della funzionalità renale)➤ Elevata efficacia ≥95%➤ Permette la stabilizzazione della patologia prima della tiroidectomia o della terapia con ¹³¹I➤ Costo contenuto nel breve periodo	<ul style="list-style-type: none">➤ Non curativa: il tumore continua a crescere e può diventare maligno➤ Tasso di recidiva del 100% se interrotta➤ Necessaria compliance del proprietario (somministrazioni BID o SID)➤ Possibili effetti avversi in un 25% dei gatti➤ Scarsa o nessuna risposta in una piccola % di gatti➤ Maggiore frequenza dei controlli per valutarne efficacia e sicurezza➤ Costo sfavorevole nel lungo periodo➤ Non raccomandata nei rari casi di carcinoma tiroideo	<ul style="list-style-type: none">➤ Nessuna

Metimazolo

Il metimazolo (o tiamazolo) inibisce la perossidasi tiroidea determinando il blocco della sintesi di T₃ e T₄. Non interferendo con il rilascio degli ormoni già formati, la normalizzazione delle concentrazioni sieriche di T₄ viene raggiunta dopo 2-4 settimane dall'inizio della terapia.¹⁰

Non determina una riduzione delle dimensioni dei noduli che nel tempo, nonostante il trattamento, possono aumentare. Ad oggi in Italia esistono 2 formulazioni registrate per la medicina veterinaria, il Felimazole® compresse rivestite (Dechra s.r.l.) e l'Apelka® (Boheringer Ingheleim) che è una formulazione liquida appetibile.

La dose iniziale consigliata è di 1,25-2,5 mg due volte al giorno per os; un dosaggio doppio (5mg BID) può essere usato in caso di valori estremamente elevati di T₄ in assenza di alterazioni dei parametri di funzionalità renale.^{3,11} La somministrazione del farmaco in un'unica dose giornaliera può essere presa in considerazione dopo il raggiungimento dello stato di eutiroidismo.³

Nei gatti che tollerano il farmaco senza sviluppare effetti avversi l'efficacia supera il 90%.

Circa il 18% dei pazienti trattati nei vari studi ha sviluppato effetti collaterali quali disturbi gastro enterici, discrasie ematiche, escoriazioni facciali ed epatotossicità^{10,12,13,14} che più frequentemente si verificano nelle prime 4-6 settimane di terapia, meno frequentemente dopo 2-3 mesi di trattamento.¹⁰

Sintomi gastroenterici:

- 23% → anoressia, vomito, letargia e segni GI aspecifici.

Sono più frequenti nelle prime 4 settimane di trattamento, si risolvono solitamente diminuendo il dosaggio o passando ad una formulazione transdermica.

Sono dovuti in parte all'irritazione gastrica diretta da parte del farmaco.

Discrasie ematiche moderate:

- 16% → Leucopenia, eosinofilia, linfocitosi.

Se non associate a segni clinici continuare il trattamento con metimazolo.

Discrasie ematiche gravi:

- 2,8% → marcata trombocitopenia
- 2,7% → agranulocitosi e neutropenia
- Un case report → anemia (compresa anemia aplastica)¹³

Sospendere il trattamento e non reintrodurre il farmaco.

Reazioni dermatologiche:

- 4% → escoriazioni di faccia e collo, eritema generalizzato e prurito.

Sono solo parzialmente responsive ai corticosteroidi e solitamente richiedono l'interruzione del farmaco.

Epatotossicità:

- 2-6% → aumento di fosfatasi alcalina e bilirubina o ALT +/- associati a ittero e anoressia.

Solitamente i valori rientrano nei range dopo qualche settimana dall'inizio della terapia che va sospesa solo in casi gravi.

Diatesi emorragica:

- 2,5% → epistassi, sanguinamenti orali.

Ad alte dosi il metimazolo può inibire i fattori della coagulazione Vit. K dipendenti e l'epossido riduttasi.

Formazione di anticorpi antinucleo:

- 23%

Causa la positività all'ANA test.

Miastenia gravis, linfadenopatia periferica generalizzata, follicolite piogranulomatosa:

Solo rari casi riportati in letteratura.¹⁵⁻¹⁹

Metimazolo transdermico

Una possibile alternativa alla terapia orale è la somministrazione di una formulazione transdermica di metimazolo all'interno di un organogel di lectina pleuronica (PLO) che ne facilita l'assorbimento attraverso l'epidermide. In Italia è disponibile solo come prodotto galenico. La pomata deve essere applicata sulla faccia interna del padiglione auricolare facendo attenzione a rimuovere eventuali residui di gel rimasti precedentemente e alternando le orecchie ad ogni somministrazione (Video 1). Il proprietario deve sempre indossare i guanti durante tale operazione. La dose di partenza consigliata è la stessa utilizzata per il metimazolo in compresse (2,5 mg/gatto BID), stessa cosa vale per gli eventuali adeguamenti della dose.³

Gli effetti avversi sull'apparato gastroenterico sono minori se comparato con il metimazolo PO.¹² Con questo tipo di formulazione l'assorbimento risulta tuttavia meno costante rispetto alla formulazione PO e può rendere più difficoltoso mantenere i valori di T₄ entro i range di riferimento nel lungo periodo.²⁰

Carbimazolo

È un derivato del metimazolo e agisce come profarmaco venendo convertito efficacemente in metimazolo all'interno dell'organismo. La dose di partenza richiesta è di 10 mg una volta al giorno e risulta solitamente efficace nella maggior parte dei gatti. In casi con ipertiroidismo grave, con T₄ estremamente elevato, può essere indicato iniziare con 15 mg una volta al giorno. Se necessario le dosi possono essere aumentate o diminuite o è possibile somministrarlo a giorni alterni.³

Non è raccomandato nei gatti intolleranti al metimazolo poiché gli effetti avversi sono analoghi.

Da alcuni studi emerge che la prevalenza di effetti avversi durante la terapia con carbimazolo risulta inferiore rispetto a quella riscontrata durante il trattamento con metimazolo.^{10,21,22}

Frénais e colleghi (2008) hanno studiato, nei gatti sani, la farmacocinetica del metimazolo contenuto in compresse a rilascio controllato (Vidalta®, MSD)²³. I risultati dello studio comparativo tra carbimazolo compresse e carbimazolo nuova formulazione mostrano che queste ultime non determinano un pronunciato picco plasmatico di metimazolo e mostrano una presenza costante del principio attivo in circolo. Questo riscontro supporta l'uso in un'unica somministrazione giornaliera nei gatti con ipertiroidismo (15 mg/die sia come dose iniziale che per il mantenimento).^{23,24}

Riducendo la frequenza di somministrazione ci si aspetta una maggiore compliance da parte del proprietario, fondamentale per migliorare la gestione della patologia.

Monitoraggio terapeutico

Il follow-up di un paziente ipertiroideo prevede un primo controllo a 2-3 settimane dall'inizio della terapia al fine di valutare la concentrazione sierica di T₄ totale, monitorare la funzionalità renale ed escludere la comparsa di possibili effetti avversi alla terapia medica. È necessario pertanto effettuare un'accurata anamnesi, valutare il gatto da un punto di vista clinico (peso corporeo e body condition score, palpazione cervicale, auscultazione cardiaca, valutazione della pressione sistolica ed esame del fondo dell'occhio) e laboratoristico (CBC, parametri renali ed epatici). I monitoraggi successivi, in corso di terapia medica, andranno effettuati ogni 2-3 settimane qualora venisse modificato il dosaggio e fino al raggiungimento

dell'eutiroidismo. I pazienti stabili, senza patologie concomitanti devono essere rivalutati dopo 3 mesi dall'inizio della terapia e poi ogni 6 mesi.³

Il tempo tra la somministrazione di metimazolo e il prelievo ematico per la misurazione del T₄ totale non è importante, è tuttavia importante che il giorno del prelievo il gatto abbia assunto il farmaco.¹⁸

Ematologia

Le alterazioni ematologiche in corso di terapia con farmaci antitiroidei possono essere lievi e subcliniche o più gravi (neutropenia, agranulocitosi, trombocitopenia, anemia emolitica). Vista la bassa incidenza di tali problematiche, almeno le più gravi, non è necessario eseguire un esame emocromocitometrico ad ogni controllo ma solo nei casi in cui l'animale mostri segni clinici non spiegabili dal solo ipertiroidismo.³

Biochimica

La funzione renale deve essere valutata ad ogni visita di controllo.³ Nei gatti trattati con iodio radioattivo è stato dimostrato che la velocità di filtrazione glomerulare (GFR) si stabilizza (diminuendo) dopo circa un mese di terapia.^{25,26,27}

La maggior parte dei gatti ipertiroidei presenta inizialmente elevati livelli degli enzimi epatici. Dopo la radioiodio terapia gli enzimi epatici si normalizzano entro sei settimane.³ In uno studio è stato visto che dopo 20 settimane di trattamento con metimazolo, l'80% dei gatti presentava una concentrazione di alanina-aminotransferasi (ALT) inferiore a valori pretrattamento, ma solo il 25% aveva un valore entro l'intervallo di riferimento.²⁸ L'aumento degli enzimi epatici non necessita solitamente di indagini specifiche (es. biopsia epatica), a meno che non vi sia alcun decremento dopo 2 mesi di terapia o il soggetto manifesti anoressia e ittero.³ L'aumento o il mancato decremento delle concentrazioni degli enzimi epatici in corso di terapia può essere legato a: controllo inadeguato dell'ipertiroidismo, progressione o insorgenza di malattia epatica primaria, o epatopatia indotta dal farmaco (non frequente).

Modifiche del dosaggio

Nella maggiore parte dei gatti ipertiroidei il T₄ rientra nei range in 2-3 settimane, di conseguenza il T₄ deve essere rivalutato dopo questo periodo. Se il paziente è ancora ipertiroideo la dose di metimazolo può essere aumentata di 1,25-2,5 mg/giorno fino a che non

viene raggiunto l'eutiroidismo. Quando la dose di mantenimento eccede i 10 mg/giorno è bene accertarsi della compliance del proprietario. Se il T₄ scende al di sotto del limite inferiore dell'intervallo di riferimento è necessario ridurre la dose di 1,25-2,5 mg/giorno ed è opportuno rivalutare la funzionalità renale dopo una settimana.³ Si può seguire uno schema simile per i gatti in terapia con metimazolo transdermico. Prendere in considerazione di passare al metimazolo per bocca qualora dovessero comparire segni di irritazione cutanea in seguito alla somministrazione transdermica. Nei gatti in terapia con carbimazolo l'incremento del dosaggio non deve eccedere i 5 mg/giorno. La somministrazione a giorni alterni può essere presa in considerazione per gatti che necessitano di un dosaggio inferiore ai 10 mg/giorno. Indicazioni, posologia e effetti avversi dei principali farmaci antitiroidei sono riassunti in Tabella 5.

Outcome

Il metimazolo o il carbimazolo non distruggono il tessuto iperplastico o adenomatoso che può quindi continuare a crescere. Le dimensioni, il volume e il numero di noduli tiroidei funzionanti aumenteranno proporzionalmente alla durata della patologia quindi potrebbe aumentare in proporzione la dose di farmaco necessaria per controllare la tireotossicosi.¹⁴ Qualora il gatto non dovesse tollerare la dose di metimazolo/carbimazolo necessaria o dovesse diventare resistente, sarà necessario considerare altre opzioni terapeutiche.²⁹

Tabella 5			
Indicazioni, posologia ed effetti avversi dei principali farmaci antitiroidei			
Farmaco	Indicazioni	Dose	Effetti avversi
METIMAZOLO	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Gatti ipertiroidei con azotemia ➤ Clienti che rifiutano la radioterapia ➤ Gatti con patologie concomitanti che non giustificano la spesa per la radioterapia 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dose iniziale: 2,5 mg/gatto BID ➤ Nel monitoraggio: se T₄ sotto al range → < la dose di 2,5 mg/die ➤ Nel monitoraggio: se permane l'ipertiroidismo → aumentare la dose di 2,5 mg/die 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Segni GI ➤ Discrasie ematiche ➤ Reazioni dermatologiche ➤ Epatotossicità ➤ Diatesi emorragica
CARBIMAZOLO	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Le stesse del metimazolo 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dose iniziale: 10 mg/gatto SID ➤ Incrementi: non superiori a 5 mg/die 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Segni GI ➤ Discrasie ematiche ➤ Reazioni dermatologiche ➤ Epatotossicità ➤ Diatesi emorragica
METIMAZOLO GEL PLO	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Gatti aggressivi ai quali è impossibile somministrare prodotti per via orale ➤ Gatti in terapia con metimazolo cpr che sviluppano sintomatologia GI 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dose iniziale: 2,5 mg/gatto BID ➤ Indicazioni analoghe al metimazolo per gli adeguamenti della dose 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Irritazione/eritema locale ➤ Segni GI in % minore rispetto al metimazolo cpr

PRESSIONE ARTERIOSA SISTEMICA

La misurazione della pressione arteriosa deve essere eseguita di routine nei gatti ipertiroidici. L'ipertensione inizialmente è poco frequente, ma può svilupparsi dopo diversi mesi di terapia e può essere o meno correlata alla presenza di una nefropatia sottostante. Morrow e coll. (2009) hanno riscontrato una prevalenza di ipertensione del 13% in una popolazione di gatti ipertiroidici non trattati, e una incidenza del 23% in corso di terapia per l'ipertiroidismo.³⁰ Un altro studio ha evidenziato che non vi sono differenze significative nella probabilità di avere una CKD o l'ipertensione tra gatti con lieve, moderato o grave ipertiroidismo. Al contrario gatti con ipertiroidismo grave erano significativamente più affetti da patologie cardiache con maggiore rischio di scompenso.³¹ La pressione arteriosa andrebbe misurata al momento della diagnosi e monitorata durante i primi sei mesi, dopo il ripristino dell'eutiroidismo e poi ogni due anni. Se presente, è bene che l'ipertensione venga trattata.³

TRATTAMENTO FARMACOLOGICO E FUNZIONALITÀ RENALE

La funzione renale è profondamente influenzata dallo stato funzionale della tiroide. Eccessive concentrazioni di ormone tiroideo portano ad un aumento della gittata cardiaca e a una diminuzione delle resistenze vascolari periferiche; ne risulta un aumento della velocità di filtrazione glomerulare con conseguente diminuzione della concentrazione di creatinina circolante. La successiva normalizzazione del T₄ determina una normalizzazione della velocità di filtrazione glomerulare ed è possibile che vengano smascherate sottostanti alterazioni della funzionalità renale, con conseguente sviluppo di iperazotemia.³² Nella radioiodio terapia è stato visto che il GFR diminuisce entro 4 settimane dal trattamento, dopodiché si stabilizza.

Azotemia-ipertiroidismo

La malattia renale cronica (CKD) e l'ipertiroidismo sono due problematiche che si incontrano spesso nei pazienti anziani. La CKD può essere evidente già alla diagnosi o svilupparsi (o risultare evidente) soltanto durante la terapia per l'ipertiroidismo. In entrambi i casi è indicata una gestione secondo le linee guida (IRIS: www.iris-kidney.com). Nei gatti con concomitante CKD il trattamento dell'ipertiroidismo è solitamente indicato; in tali pazienti è tuttavia particolarmente importante evitare l'ipotiroidismo.^{33,34} Le raccomandazioni terapeutiche differiscono a seconda dello stadio IRIS, risulta quindi importante determinare correttamente la funzionalità renale prima di iniziare la terapia per l'ipertiroidismo. Bisogna ricordare che la

cachessia può influenzare i livelli sierici di urea (aumenta per maggiore turnover proteico) e creatinina (diminuisce per la perdita di massa muscolare).

I gatti con iperazotemia alla diagnosi hanno un tempo di sopravvivenza più breve rispetto ai gatti senza preesistente iperazotemia.³⁵ Williams e coll. (2010a), hanno dimostrato che la sopravvivenza mediana è stata di 178 giorni per i gatti ipertiroidei con iperazotemia o precedentemente diagnosticata malattia renale cronica (CKD) e giorni 612 per i gatti ipertiroidei non azotemici.³⁶

Preesistente azotemia in un gatto ipertiroideo di nuova diagnosi

Con questo scenario il trattamento può risultare più complesso. In primo luogo, la diagnosi di ipertiroidismo a volte può essere difficile a causa di una diminuzione del T₄ (che può risultare entro i valori di riferimento) dovuta alla CKD (*euthyroid sick syndrome*). In secondo luogo, dato l'ulteriore calo del GFR indotto dalla risoluzione dello stato di ipertiroidismo, è opportuno non approcciare il paziente con chirurgia o radioiodio terapia bensì è appropriato utilizzare una terapia farmacologica. Per gatti con stadio IRIS III o IV la malattia deve essere gestita con attenzione cercando di garantire la qualità della vita del soggetto. In questi animali il trattamento per l'ipertiroidismo deve essere iniziato con prudenza e idealmente a dosaggi più bassi. Con uno stadio IRIS I o II il trattamento per l'ipertiroidismo deve essere iniziato normalmente.³

Sviluppo di azotemia renale post-trattamento

Nel caso di sviluppo di iperazotemia in corso di trattamento non è solitamente necessario diminuire la dose del farmaco. Williams e coll. (2010a) hanno dimostrato che il 15% (41 su 268 gatti) dei soggetti sviluppava iperazotemia entro 240 giorni dalla diagnosi e l'inizio della terapia.³⁶ Tuttavia, lo stesso studio ha dimostrato che lo sviluppo di iperazotemia non influenzava la sopravvivenza dei gatti in trattamento per ipertiroidismo. Mantenere i gatti azotemici "un po' ipertiroidei" per aumentare la perfusione renale e abbassare i livelli sierici di creatinina è deleterio. Con questo approccio si può esacerbare il danno renale: elevati livelli di T₄ aumentano l'attività beta-adrenergica e attivano il sistema renina angiotensina aldosterone (RAAS) che determina un aumento dell'output cardiaco, overload volumetrico, ritenzione di sodio, ipertensione glomerulare e glomerulo sclerosi che, in ultimo, determina la progressione, o peggiora la CKD. La comparsa di una lieve insufficienza renale stabile non deve

pertanto indurre a modificare il trattamento. La dose va diminuita solo nel caso di sviluppo di grave iperazotemia e malessere dell'animale. Vari studi hanno dimostrato che la concentrazione di creatinina sierica può continuare ad aumentare per 6 mesi dopo il raggiungimento dell'eutiroidismo, mentre il calo del GFR si verifica nel primo mese e poi tende a stabilizzarsi. Si consiglia quindi di monitorare la concentrazione sierica di creatinina per almeno 6 mesi dopo aver riportato alla normalità i valori del T₄.

TERAPIA MEDICA E IPOTIROIDISMO

L'ipotiroidismo iatrogeno è una complicazione nota della terapia dell'ipertiroidismo, e viene definito come una diminuzione del T₄ in concomitanza ad un aumento del TSH (misurato con la metodica validata nel cane).³⁷ I segni clinici dell'ipotiroidismo possono includere: letargia, inappetenza, aumento di peso e alterazioni dermatologiche. Nella maggiore parte degli studi, la diagnosi di ipotiroidismo si basa sul riscontro di concentrazioni di T₄ al di sotto dell'intervallo di riferimento in seguito al trattamento.^{26,38,39} Tuttavia, basandosi esclusivamente sulla concentrazione di T₄ basale, si potrebbe incorrere in errori diagnostici per diversi motivi: una bassa concentrazione di T₄ in corso di terapia per l'ipertiroidismo non sempre si associa a segni clinici, gli intervalli di riferimento per il T₄ nel gatto raramente sono specifici per una popolazione geriatrica (che tende ad avere valori di T₄ più bassi), la concentrazione di T₄ può essere soppressa dalla presenza di patologie concomitanti e in seguito a somministrazione di farmaci.^{10,40} Inoltre, riuscire a discriminare tra segni legati alla risoluzione dell'ipertiroidismo piuttosto che a un ipotiroidismo in fase iniziale può non essere semplice.

Williams e colleghi (2010b) hanno evidenziato come l'iperazotemia sia significativamente più probabile nei gatti con ipotiroidismo iatrogeno, e che l'associazione di ipotiroidismo iatrogeno e iperazotemia era associata a un minore tempo di sopravvivenza.³⁷ Un altro studio suggerisce che la funzione renale migliora dopo il ripristino di una normale funzionalità tiroidea nei gatti con ipotiroidismo iatrogeno.⁴¹

Si evince quindi che riuscire ad identificare con certezza i gatti con ipotiroidismo iatrogeno risulta importante per potere intervenire tempestivamente. Nell'uomo la misurazione del TSH è molto più sensibile rispetto a T₄ e fT₄ nel rilevare minime alterazioni della funzionalità tiroidea.⁴² Alcuni studi, che hanno valutato la concentrazione di TSH nei gatti in terapia con metimazolo o dopo radioiodio terapia, sembrano avvalorarne l'utilizzo come parametro utile per discriminare i casi di ipotiroidismo iatrogeno. Uno studio ha determinato la prevalenza

dell'ipotiroidismo iatrogeno in 125 gatti in terapia con metimazolo e ha comparato l'abilità di T_4 e fT_4 in associazione al TSH nel definirne la funzionalità tiroidea. La prevalenza di ipotiroidismo iatrogeno è risultata essere del 20% e il TSH sembrerebbe indicare che l'iperazotemia, qualora presente, sia almeno in parte correlata allo sviluppo di ipotiroidismo.⁴³

Peterson e colleghi (2017) hanno evidenziato come il riscontro di elevate concentrazioni di TSH rappresenti un parametro più sensibile e specifico rispetto a T_4 e fT_4 nel diagnosticare l'ipotiroidismo in gatti che sviluppano CKD iperazotemica dopo il trattamento con ^{131}I . I dati di questo studio suggeriscono inoltre che una concentrazione di TSH maggiore di 0,9 ng/mL in gatti trattati con ^{131}I sia consistente con la diagnosi di ipotiroidismo iatrogeno.⁴⁴ Un altro studio effettuato su gatti con ipertiroidismo lieve trattati con ^{131}I , ha classificato i gatti in ipertiroidei, eutiroidei, gatti con ipotiroidismo conclamato e subclinico, sulla base delle concentrazioni sieriche di T_4 e TSH. Tutti i gatti eutiroidei avevano concentrazioni sieriche di TSH al di sotto di 0,4 ng/mL, al contrario, tutti i gatti ipertiroidei avevano valori > 0,4 ng/mL.⁸

Tenendo in considerazione tutte queste informazioni le linee guida per il trattamento dell'ipertiroidismo suggeriscono di:³

- diminuire di un 25-50% la dose di farmaco antitiroideo se la concentrazione di T_4 è molto bassa (<10 nmol/L) e/o se il T_4 è nella metà inferiore del range ed il TSH è elevato, anche in assenza di segni clinici;
- non modificare la dose se il gatto non presenta segni clinici, le concentrazioni di T_4 sono tra i < 10 nmol/L e i 15 nmol/L e non è presente iperazotemia;
- ridurre la dose se il T_4 < 10 nmol/L e il gatto è azotemico;
- se il gatto sta assumendo la dose minima di farmaco (es. 2,5 mg/die di metimazolo o 10 mg di carbimazolo SID) questo può essere somministrato ogni 36 o 48 ore.

MONITORAGGIO DEI GATTI IPERTIROIDEI CON CONCOMITANTI PATOLOGIE CARDIACHE

Le patologie cardiache sono comuni nei gatti ipertiroidei e possono o meno essere dovute all'endocrinopatia sottostante. In questi casi bisogna correggere l'ipertiroidismo e poi rivalutare la patologia cardiaca una volta raggiunto l'eutiroidismo. Gatti con ipertiroidismo neo diagnosticato ed insufficienza cardiaca congestizia (CHF) richiedono un trattamento simultaneo delle due patologie e regolari monitoraggi per la CHF una volta che il gatto è tornato eutiroideo.

TERAPIA ALIMENTARE

La sintesi degli ormoni tiroidei necessita di un sufficiente uptake di iodio alimentare da parte della tiroide. L'ultima frontiera nella terapia dell'ipertiroidismo felino consiste pertanto nella possibilità di ridurre le concentrazioni di ormoni tiroidei mediante la somministrazione di un alimento a basso contenuto di iodio (Hill's Prescription Diet y/d). Riuscendo ad ottenere una buona compliance da parte dei proprietari, il 75% dei gatti ipertiroidei alimentati esclusivamente con questa dieta mostra una significativa diminuzione del T₄ e un miglioramento dei segni clinici in quattro settimane.^{45,46} La normalizzazione del T₄ può richiedere più di 180 giorni in gatti con valori iniziali di tale ormone molto elevati e, in alcuni casi, non si riesce a raggiungere l'eutiroidismo.⁴⁶ Nonostante la normalizzazione del T₄ molti gatti non mostrano l'incremento ponderale atteso.^{45,46,47} La precedente assunzione di farmaci antitiroidei non influenza l'efficacia della terapia dietetica,⁴⁵ al contrario non se ne conosce l'effetto sulla sensibilità tiroidea alla terapia con ¹³¹I.⁴⁸ Nonostante non siano riportati effetti avversi nel breve periodo sono necessari ulteriori studi per valutarne l'efficacia e la sicurezza come terapia a lungo termine. Recentemente, uno studio randomizzato controllato ha dimostrato come l'assunzione esclusiva, da parte di gatti adulti sani, di una dieta a basso contenuto di iodio per 24 mesi non porti a variazioni nella funzionalità tiroidea.⁴⁹

Tabella 3
Caratteristiche della terapia alimentare

Terapia alimentare		
Vantaggi	Svantaggi	Controindicazioni
<ul style="list-style-type: none">➤ Reversibilità➤ Tasso di risposta ≥82%➤ Effetti collaterali quasi nulli (necessari ulteriori studi)➤ Non stressante per il gatto➤ Sicura in gatti con insufficienza renale➤ Efficacia non influenzata da precedenti terapie farmacologiche➤ Non necessario wash out prima della chirurgia	<ul style="list-style-type: none">➤ Non curativa➤ Scarsa appetibilità➤ 25% dei gatti ancora ipertiroidei dopo 8 settimane➤ Con elevati valori di T4 necessario + tempo per raggiungere l'eutiroidismo➤ Mancato miglioramento di tutti i segni clinici (es: BCS)➤ Tasso di recidiva del 100% se interrotta➤ Alimentazione esclusiva per tutta la vita➤ Patologie concomitanti che necessitano di un regime dietetico specifico➤ Gatti che assumono farmaci aromatizzati (possono contenere iodio)➤ Non si conosce l'influenza sull'eventuale terapia con ¹³¹I (necessario wash out?)	<ul style="list-style-type: none">➤ Nessuna

TERAPIA CHIRURGICA

L'asportazione chirurgica della tiroide costituisce una valida possibilità terapeutica per l'ipertiroidismo. È una procedura efficace, rapida e di relativamente facile esecuzione. Nel 70% dei casi il coinvolgimento di entrambi i lobi tiroidei rende necessario l'esecuzione di una tiroidectomia bilaterale.^{50,51} Prima di eseguire l'intervento chirurgico è importante effettuare un periodo di terapia con farmaci antitiroidei per almeno due settimane per stabilizzare i livelli di T₄ e fare sì che il paziente risulti più stabile da un punto di vista cardiocircolatorio.

Tabella 4		
Caratteristiche della terapia chirurgica		
Tiroidectomia		
Vantaggi	Svantaggi	Controindicazioni
<ul style="list-style-type: none">➤ Curativa nel ≥90% se viene effettuata una tiroidectomia bilaterale➤ Curativa nel 35-60% se viene effettuata una tiroidectomia monolaterale➤ Eutiroidismo raggiunto in 1-2 giorni➤ Non richiede particolari strumentazioni➤ Tecnica chirurgica semplice➤ Tasso di recidiva: 5% se bilaterale, ≤30% se monolaterale	<ul style="list-style-type: none">➤ Irreversibile➤ Necessaria stabilizzazione prechirurgia➤ Rischi anestesilogici➤ Possibile sviluppo di ipoparatiroidismo transitorio o permanente➤ Possibile sviluppo di ipotiroidismo transitorio o permanente➤ Possibile danneggiamento del nervo laringeo ricorrente (raro)➤ Possibile Sindrome di Horner (raro)➤ Necessaria ospedalizzazione➤ Elevato costo iniziale	<ul style="list-style-type: none">➤ Insufficienza renale grave➤ Tessuto tiroideo ectopico➤ Carcinoma metastatico➤ Grave compromissione sistemica➤ Aritmie o insufficienza cardiaca

La tecnica intracapsulare è da preferirsi rispetto a quella extracapsulare visto il minor rischio di una compromissione (danno o rimozione) della ghiandola paratiroidea adiacente.

La più grave complicazione postoperatoria, soprattutto in caso di tiroidectomia bilaterale, è l'ipocalcemia (6-82%) per ipoparatiroidismo iatrogeno generalmente transitorio; motivo per cui, è necessario monitorare le concentrazioni di calcio sierico (idealmente il calcio ionico) per almeno una settimana dall'intervento. Il trattamento dell'ipocalcemia si rende necessario qualora si manifestino segni clinici associati (Tabella 6) o se le concentrazioni di calcio totale sierico risultino inferiori a 6,5 mg/dl anche in assenza di sintomatologia.

Tabella 6 Segni clinici associati ad ipocalcemia nel gatto

Anoressia
Letargia
Irritabilità
Comportamenti anomali
Crampi o dolori muscolari
Tremori muscolari specialmente di faccia e orecchie
Tetania
Convulsioni

Altre complicazioni della tiroidectomia includono la sindrome di Horner, la paralisi del nervo laringeo e la recidiva dell'ipertiroidismo.⁵² La scintigrafia può svelare la presenza di un coinvolgimento bilaterale della tiroide o di una patologia multinodulare; se eseguita prima della chirurgia permette di diminuire il numero di tiroidectomie subtotali. Risulta inoltre una tecnica molto utile per svelare la presenza di tessuto adenomatoso in siti ectopici (4-9% dei casi) o di metastasi da carcinoma tiroideo che altrimenti sfuggirebbero al chirurgo. La tiroidectomia monolaterale si associa a ipotiroidismo transitorio che si risolve nel giro di 1-3 mesi. La tiroidectomia bilaterale può portare a ipotiroidismo clinicamente manifesto che necessita di supplementazione ormonale.

52

Outcome:

La tiroidectomia è associata ad un elevato tasso di successo terapeutico, più del 90% dei gatti raggiunge l'eutiroidismo ed il tasso di recidiva è del 5% nei 3 anni successivi.⁵³ L'eutiroidismo viene raggiunto di solito in 24-48 ore post chirurgia.

PROGNOSI

La sopravvivenza mediana per gatti ipertiroidei senza una concomitante CKD supera i 5,3 anni mentre se non trattata è una patologia progressiva con elevata morbilità e mortalità. La prognosi peggiora per i gatti ipertiroidei con carcinoma. Tuttavia, con un adeguato trattamento, anche questi pazienti possono vivere a lungo e morire per patologie non correlate alla neoplasia.

BIBLIOGRAFIA

1. Peterson ME and Beeker DV. Radioiodine treatment of 524 cats with hyperthyroidism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207:1422-1428, 1995.
2. Slater MR, Komkov A, Robinson LE, *et al.* Long-term follow-up of hyperthyroid cats treated with iodine-131. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 35:204-209, 1994.
3. Daminet S, Kooistra HS, Fracassi F, *et al.* Best practice for the pharmacological management of hyperthyroid cats with antithyroid drugs. *Journal of Small Animal Practice* 55:4-13, 2014.
4. Craig A. A prospective study of 66 cases of feline hyperthyroidism treated with a fixed dose of intravenous 131-I. *Australian Veterinary Practitioner* 23:2-6, 1993.
5. Meric SM and Rubin SI. Serum thyroxine concentrations following fixed-dose radioactive iodine treatment in hyperthyroid cats: 62 cases (1986-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197:621-623, 1990.
6. Van Dijk IC and Hof AJ. Treatment of feline hyperthyroidism with radioactive iodine-131. *Tijdschr Diergeneeskde* 133:54-62, 2008.
7. Peterson ME and Broome MR. Ultra-low doses of radioiodine are highly effective in restoring euthyroidism without inducing hypothyroidism in most cats with milder forms of hyperthyroidism: 131 cases (abstract). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:1031, 2014.
8. Lucy JM, Peterson ME, Randolph JF, *et al.* Efficacy of low-dose (2 millicurie) versus standard-dose (4 millicurie) radioiodine treatment for cats with mild-to-moderate hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31:326-334, 2017.
9. Mooney CT. Feline hyperthyroidism: diagnostics and therapeutics. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 31: 963-983, 2001.
10. Peterson ME, Kintzer PP and Hurvitz AI. Methimazole treatment of 262 cats with hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2:150-157, 1988.
11. Trepanier LA. Pharmacologic management of feline hyperthyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 37:775-788, 2007.
12. Sartor LL, Trepanier LA, Kroll MM, *et al.* Efficacy and safety of transdermal methimazole in the treatment of cats with hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18:651-655, 2004.
13. Weiss DJ. Aplastic anemia in cats-clinicopathological features and associated disease conditions 1996-2004. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 8:203-206, 2006.
14. Hill KE, Giese MA, Kingsbury D, *et al.* The efficacy and safety of a novel lipophilic formulation of methimazole for the once daily transdermal treatment of cats with hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25:1357-1365, 2011.
15. Shelton GD, Joseph R, Richter K, *et al.* Acquired myasthenia gravis in hyperthyroid cats on Tapazole therapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11:120, 1997.
16. Bell ET, Mansfield CS and James FE. Immune-mediated myasthenia gravis in a methimazole-treated cat. *Journal of Small Animal Practice* 53:661-663, 2012.

17. Niessen SJM, Voyce MJ, de Villiers L, *et al.* Generalised lymphadenomegaly associated with methimazole treatment in a hyperthyroid cat. *Journal of Small Animal Practice* 48:165-168, 2007.
18. Rutland BE, Nachreiner RF and Kruger JM. Optimal testing for thyroid hormone concentration after treatment with methimazole in healthy and hyperthyroid cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:1025-1030, 2009.
19. Castro López J, Lloret A, Ravera I, *et al.* Pyogranulomatous mural folliculitis in a cat treated with methimazole. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16:527-531, 2014.
20. Boretti FS, Sieber-Ruckstuhl NS, Schäfer S, *et al.* Transdermal application of methimazole in hyperthyroid cats: a long-term follow-up study. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16:453-459, 2014.
21. Mooney CT, Thoday KL and Doxey DL. Carbimazole therapy of feline hyperthyroidism. *Journal of Small Animal Practice* 33:228-235, 1992.
22. Bucknell D.G. Feline hyperthyroidism: spectrum of clinical presentations and response to carbimazole therapy. *Australian Veterinary Journal*, 78:462-465, 2000.
23. Frénais R, Burgaud S and Horspool LJ. Pharmacokinetics of controlled-release carbimazole tablets support once daily dosing in cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31: 213-219, 2008.
24. Frénais R, Rosenberg D, Burgaud S, *et al.* Clinical efficacy and safety of once-daily formulation of carbimazole in cats with hyperthyroidism. *Journal of Small Animal Practice* 50:510-515, 2009.
25. van Hoek I, Lefebvre HP, Peremans K *et al.* Short- and long-term follow-up of glomerular and tubular renal markers of kidney function in hyperthyroid cats after treatment with radioiodine. *Domestic Animal Endocrinology* 36:45-56, 2009.
26. Boag A, Neiger R, Slater L, *et al.* Changes in the glomerular filtration rate of 27 cats with hyperthyroidism after treatment with radioactive iodine. *Veterinary Record* 161:711-715, 2007.
27. van Hoek I, Lefebvre HP, Kooistra HS, *et al.* Plasma clearance of exogenous creatinine, exo-iohexol, and endo-iohexol in hyperthyroid cats before and after treatment with radioiodine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22:879-885, 2008.
28. Chapman E, Johnston L and Graham P. Treatment of feline hyperthyroidism with 2.5 mg thiamazole (methimazole): efficacy and safety. *Proceeding of 15th European College of Veterinary Internal Medicine- Companion Animals*; Glasgow; 2005, Sept 1-3, pp 218-219.
29. Peterson ME, Broome MR and Rishniw M. Prevalence and degree of thyroid pathology in hyperthyroid cats increases with disease duration: a cross-sectional analysis of 2096 cats referred for radioiodine therapy. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18:92-103, 2016.
30. Morrow LD, Adams VJ, Elliott J, *et al.* Hypertension in hyperthyroid cats: prevalence, incidence and predictors of its development. *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine*; Montreal, Canada; 2009, June 3 to 6 pp 699.
31. Watson N, Murray JK, Fonfara S, *et al.* Clinicopathological features and comorbidities of cats with mild, moderate or severe hyperthyroidism: a radioiodine referral population. *Journal of Feline Medicine and Surgery* doi: 10.1177/1098612X18755925, 2018

32. van Hoek I and Daminet S. Interactions between thyroid and kidney function in pathological conditions of these organ systems: a review. *General and Comparative Endocrinology* 160:205-215, 2009.
33. Higgs P, Murray JK and Hibbert A. Medical management and monitoring of the hyperthyroid cat: a survey of UK general practitioners. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16:788-795, 2014.
34. Vaske HH, Schermerhorn T and Grauer GF. Effect of feline hyperthyroidism on kidney function: a review. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18:55-59, 2016.
35. Milner RJ, Channell CD, Levy JK, et al. Survival times for cats with hyperthyroidism treated with iodine 131, methimazole, or both: 167 cases (1996-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 228:559-563, 2006.
36. Williams TL, Peak KJ, Brodbelt D, et al. Survival and the development of azotemia after treatment of hyperthyroid cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24:863-869, 2010a.
37. Williams TL, Elliott J and Syme HM. Association of iatrogenic hypothyroidism with azotemia and reduced survival time in cats treated for hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24:1086-1092, 2010b.
38. Chun R, Garrett LD, Sargeant J, et al. Predictors of response to radioiodine therapy in hyperthyroid cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 43:587-591, 2002.
39. Nykamp SG, Dykes NL, Zarfoss MK, et al. Association of the risk of development of hypothyroidism after iodine 131 treatment with the pretreatment pattern of sodium pertechnetate TC 99m uptake in the thyroid gland in cats with hyperthyroidism: 165 cases (1990-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226:1671-1675, 2005.
40. Peterson ME, Melian C and Nicholas R. Measurement of serum concentrations of free thyroxine, total thyroxine, and total triiodothyronine in cats with hyperthyroidism and cats with non-thyroidal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218:529-536, 2001.
41. Williams TL, Elliott J and Syme HM. Effect on renal function of restoration of euthyroidism in hyperthyroid cats with iatrogenic hypothyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25:1251-1258, 2014.
42. Benhadi N, Fliers E, Visser TJ, et al. Pilot study on the assessment of the setpoint of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in healthy volunteers. *European Journal of Endocrinology* 162:323-329, 2010.
43. Aldrige C, Behrend EN, Martin LG, et al. Evaluation of thyroid-stimulating hormone, total thyroxine, and free thyroxine concentrations in hyperthyroid cats receiving methimazole treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:862-868, 2015.
44. Peterson ME, Nicholas R and Rishniw M. Serum thyroxine and thyroid-stimulating hormone concentration in hyperthyroid cats that develop azotemia after radioiodine therapy. *Journal of Small Animal Practice* 58:519-530, 2017.
45. van der Kooij M, Becvárová I, Meyer HP, et al. Effects of an iodine food restricted food on client-owned cats with hyperthyroidism. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16:491-428, 2014.
46. Hui TY, Bruyette DS, Moore GE, et al. Effect of feeding an iodine restricted diet in cats with spontaneous hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:1063-1068, 2015.

47. Fritsch D, Allen T, Dodd C, *et al.* A restricted iodine food reduces circulating thyroxine concentrations in cats with hyperthyroidism. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 12:24-32, 2014.
48. Scott-Moncrieff JC, Heng HG, Weng HY, *et al.* Effect of a limited iodine diet on iodine uptake by thyroid glands in hyperthyroid cats. *Journal of Veterinary Internal medicine* 29:1322-1326, 2015.
49. Paetau-Robinson I, Melendez LD, Forrester SD, *et al.* Comparison of health parameters in normal cats fed a limited iodine prescription food vs a conventional diet. *Journal of feline medicine and Surgery* 20:142-148, 2018.
50. Birchard SJ. Thyroidectomy in the Cat. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 21:29-33, 2006.
51. Radlinsky MG. Thyroid Surgery in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 37:789-798, 2007.
52. Welches CD, Scavelli TD, Matthiesen DT, *et al.* Occurrence of problems after three techniques of bilateral thyroidectomy in cats. *Veterinary Surgery* 18:392-296, 1989.
53. Naan EC, Kirpensteijn J, Kooistra HS, *et al.* Result of thyroidectomy in 101 cats with hyperthyroidism. *Veterinary Surgery* 35:287-293, 2006.

Capitolo 4

**Symmetric dimethylarginine (SDMA)
in hyperthyroid cats**

A. Corsini¹, S. Crosara¹, G. Carotenuto², F. Fracassi²

27th ECVIM-CA Congress, Malta, 14-16 September 2017

Journal of Veterinary Internal Medicine 32:588, 2018.

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Parma

²Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria, Bologna

BACKGROUND

Hyperthyroidism and chronic kidney disease (CKD) are two of the most common disease in old-aged cat population. Hyperthyroidism leads to a decrease in serum creatinine (sCr) by increasing glomerular filtration rate (GFR) and decreasing body muscle mass. This can mask a concurrent CKD that might become evident after the onset of treatment ¹. Symmetric dimethylarginine (SDMA) is a novel, early, renal biomarker independent of body muscle mass ², therefore it might be a useful marker of renal disease in hyperthyroid cats.

OBJECTIVES

The aim of this study was to evaluate SDMA in hyperthyroid cats at the time of diagnosis and after treatment.

MATERIALS AND METHODS

This was a retrospective observational study. Nineteen hyperthyroid cats (HT) [serum total thyroxin $TT_4 > 40$ mmol/L] with normal sCr (< 1.8 mg/dL) were included. Eighteen healthy cats, older than 7 years, with normal TT_4 and sCr < 1.8 mg/dL were enrolled as control group (CG) (Tab 1). Data about physical exam, emogram, serum biochemistry (sBC) and serum TT_4 concentrations were evaluated. SDMA was measured on the left-over serum from previous analyze and stored at -20°C . SDMA measurement was performed on serum samples collected at the time of diagnosis of hyperthyroidism and after methimazole treatment when TT_4 normalized, between 10 to 90 days after start of treatment. Follow-up was available for 8/19 hyperthyroid cats. SDMA was measured using a validated immunoassay (IDEXX SDMA test).

Table 1 – Groups composition and inclusion criteria

Hyperthyroid Cats (n=19)	Control Group (n=18)
Clinical signs	Age > 7 years
Serum $TT_4 > 40$ mmol/L	Serum $TT_4 < 40$ mmol/L
Serum creatinine < 1.8 mg/dL	Serum creatinine < 1.8 mg/dL

RESULTS

Descriptive statistics of age, sCr, TT4 and SDMA in both groups is reported in *Tab 2*. Hyperthyroid cats were older ($p=0.0005$) and had a lower body weight (BW) ($p<0.0001$) than control cats.

Table 2 – Age, sCr, TT4 and SDMA median values and interval		
	Hyperthyroid Cats	Control Group
Age (years)	15 (10-19)	11 (7-17)
sCr (mg/dL)	1.09 (0.56-1.8)	1.17 (0.79-1.79)
TT ₄ (mmol/L)	196 (67-309)	30.9 (15.4-39.9)
SDMA (µg/dL)	11 (6-19.5)	9 (6-16)

In hyperthyroid cats sCr at diagnosis was positively correlated with SDMA ($r=0.47$, $p=0.04$) and negatively correlated with TT₄ ($r=-0.46$, $p=0.04$). No correlation was found between SDMA and TT₄ at diagnosis ($p=0.10$) (*Fig 1a*).

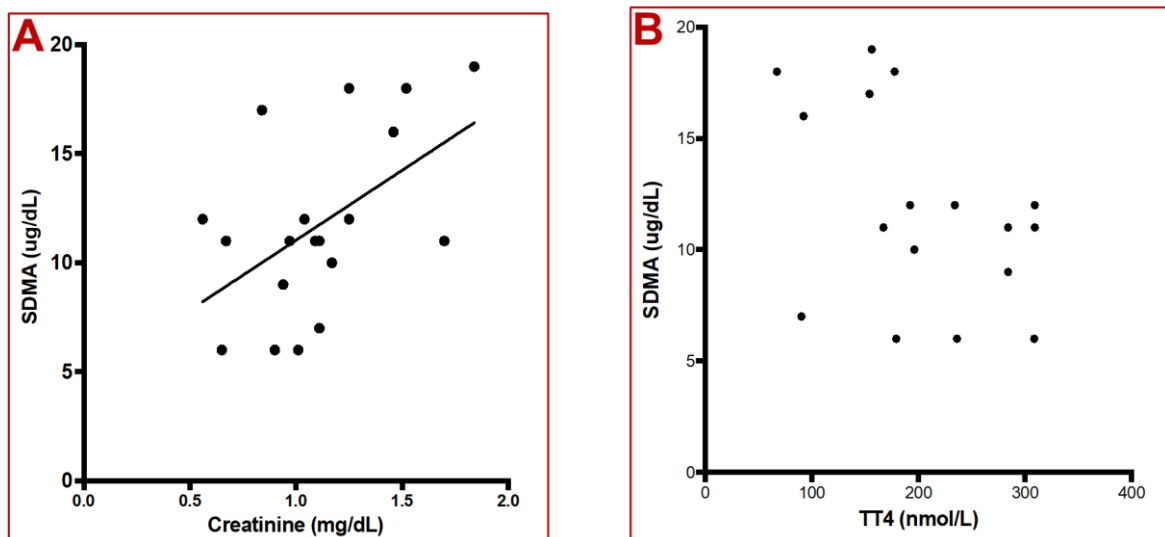


Fig 1a - Correlation between SDMA and creatinine (A) and between SDMA and TT₄ (B) in hyperthyroid and control group.

In hyperthyroid cats, BW was positively correlated with sCr ($r=0.51$, $p=0.004$) but not with SDMA ($p=0.39$). There was no difference for sCr between hyperthyroid cats at diagnosis and control group ($p=0.3$). Creatinine significantly increased ($p=0.03$) after treatment despite body weight did not ($p=0.13$). No difference was found when comparing SDMA in hyperthyroid cats at diagnosis and control group ($p=0.11$) nor after treatment ($p=0.86$) (Fig 1b).

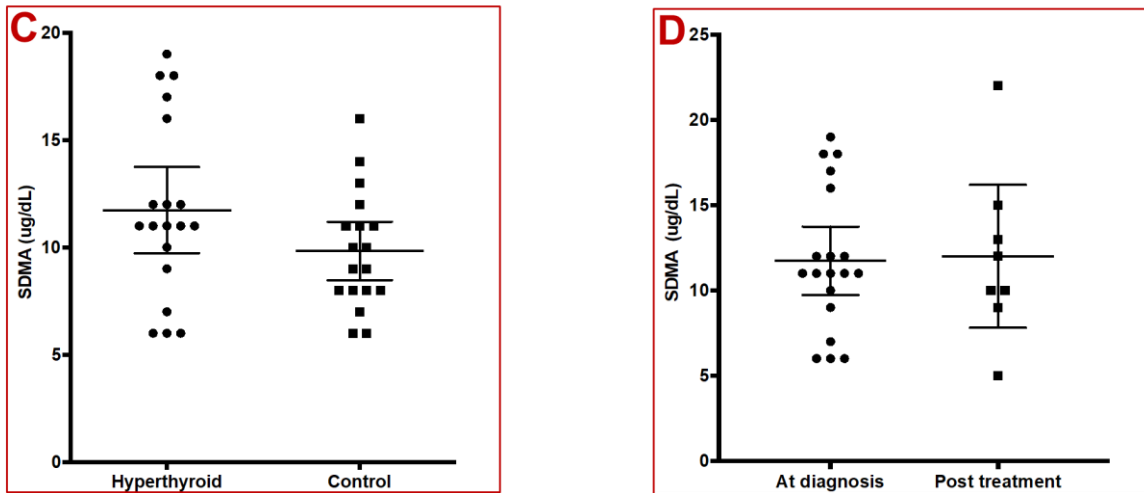


Fig 1b - Scatter plot of SDMA concentrations in both groups at the time of inclusion (C) and of SDMA concentrations at the diagnosis and after treatment with methimazole in hyperthyroid group (D).

2/8 cats showed increased creatinine when TT_4 normalized, but none of them had high SDMA at diagnosis. Five hyperthyroid cats had SDMA value higher than reference range at diagnosis. In these cats follow-up after treatment was available for 2/5 only. In these 2 cats when TT_4 was normal sCr was still normal and SDMA was increased in one and decreased in the reference range in the other one.

DISCUSSION

No significant correlation between SDMA and hyperthyroid state in cats was found. Due the low number of available follow-up evaluation of SDMA as a marker to predict unmasking of CKD after methimazole treatment was not possible. In humans it is controversial if hyperthyroidism influences SDMA concentration³. Based on this preliminary study feline hyperthyroidism seems not to influence SDMA concentration.

REFERENCES

1. Vaske HH, Schermerhorn T and Grauer GF. Effects of feline hyperthyroidism on kidney function: a review. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18:55-59, 2016.
2. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, *et al.* Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:1676–1683, 2014.
3. Ittermann T, Bahls M, Atzler D, *et al.* L-Arginine derivatives are associated with the hyperthyroid state in the general population. *Thyroid* 26:212-218, 2016.

Capitolo 5

Use of tandem mass spectrometry
(LC-MS/MS) for the measurement of
thyroid hormones in dogs
with spontaneous hypothyroidism

INTRODUZIONE

L'euthyroid sick syndrome o *non-thyroidal illness syndrome* (NTIS) si riferisce ad una alterazione del profilo tiroideo nel contesto di malattie sistemiche, acute e croniche, non tiroidee. È una risposta complessa e multifattoriale che l'organismo mette in atto per cercare di ridurre il dispendio energetico da parte dei tessuti.

Nell'uomo si osserva in più del 70% dei pazienti ospedalizzati; nella fase acuta della patologia si assiste ad una diminuzione dei valori di T_3 in associazione ad elevate concentrazioni di reverse T_3 a causa della diminuzione delle proteine di trasporto degli ormoni tiroidei e di una più rapida degradazione ormonale in relazione a variazioni nell'espressione e attività delle deiodinasi. Durante gli stati patologici protratti si verifica anche un calo della concentrazione di T_4 e free T_4 , mentre il TSH rimane di solito nei range di riferimento o al di sotto.

Studi condotti in medicina veterinaria hanno messo in evidenza una significativa riduzione della concentrazione sierica di T_3 durante stati patologici gravi (es. sepsi), al contrario le concentrazioni sieriche di fT_3 e rT_3 non sembrano esserne influenzate¹.

64

In soggetti con NTIS la misurazione di free T_4 e free T_3 sembra permettere una valutazione più accurata della funzionalità tiroidea rispetto alle corrispondenti forme legate per l'influenza degli stati patologici sulle proteine di trasporto degli ormoni tiroidei (globulina legante la tiroxina, transtiretina e albumina).

Alcuni studi in medicina umana hanno mostrato interesse nella valutazione di due metaboliti degli ormoni tiroidei, la 3,3-diiodotironina (3,3- T_2) e la 3,5-diiodotironina (3,5- T_2). Nell'uomo è stato documentato che le concentrazioni di 3,3- T_2 sono influenzate in maniera diversa a seconda della patologia presente²; non è invece chiaro il comportamento della 3,5- T_2 .

In medicina umana, la cromatografia liquida ad elevata prestazione abbinata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) è considerata la metodica d'elezione per la misurazione di molti ormoni, inclusi gli ormoni tiroidei e viene ampiamente utilizzata nella pratica clinica^{3,4}. È stata stabilita l'accuratezza di questa metodica, rispetto all'equilibrio dialitico, per la valutazione di fT_4 , fT_3 , rT_3 , 3,3- T_2 and 3,5- T_2 nel siero di uomo, cane e gatto⁵⁻⁹. Nell'uomo i saggi immunologici, rispetto alla LC-MS/MS mostrano la tendenza a sottostimare la concentrazione sierica di fT_4 nei pazienti con NTIS¹⁰ e a sovrastimarne la concentrazione nei

pazienti ipotiroidei¹¹. Pertanto, viene consigliato l'uso della LC-MS/MS per la misurazione delle forme libere degli ormoni tiroidei sia nei pazienti con ipotiroidismo che con NTIS^{12,13}.

Come accennato nel capitolo introduttivo, il principale dilemma diagnostico nella diagnosi dell'ipotiroidismo canino è riuscire a distinguere tra soggetti realmente ipotiroidei con TSH nei range di riferimento e soggetti con NTIS. Attualmente, il test di stimolazione con rhTSH e la scintigrafia tiroidea sono le uniche indagini in grado di discriminare i due scenari; l'elevato costo e la difficoltà nell'identificare strutture che offrano questi servizi rende necessaria la ricerca di un metodo alternativo. Per questo motivo abbiamo voluto indagare se la valutazione tramite LC-MS/MS di free T₄, free T₃, 3,3',5'-triiodotironina (rT₃), 3,3-diiodotironina (3,3-T₂) e 3,5-diiodotironina (3,5-T₂), fosse in grado di discriminare tra cani con ipotiroidismo e cani con NTIS.

**Use of tandem mass spectrometry
(LC-MS/MS) for the measurement of
thyroid hormones in dogs
with spontaneous hypothyroidism**

*G. Carotenuto, F. Lunetta, S. De Arcangeli, E. Malerba, F. Del Baldo, S. Corradini, F.
Fracassi*

28th ECVIM-CA Congress, Rotterdam (Olanda), 6-8 September 2018

Journal of Veterinary Internal Medicine 33:1082, 2019.

BACKGROUND

In human medicine liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is actually considered the “gold standard” for measurement of many hormones concentration and it is widely used in clinical practice ^{11,12}; its diagnostic performance has never been investigated in dogs with hypothyroidism (DWH).

OBJECTIVES

The aim of this study was to determine whether serum concentrations of *free* T₄ (fT₄), *free* T₃ (fT₃), 3,3',5'-triiodothyronine (rT₃), 3,3-diiodothyronine (3,3-T₂) and 3,5-diiodothyronine (3,5-T₂), measured with LC-MS/MS, were able to differentiate DWH (n=13) from dogs with non-thyroidal illness (DNTI) (n=12), dogs with systemic inflammatory response (SIRS dogs= SD) (n=12) and healthy dogs (HD) (n=12).

MATERIALS AND METHODS

Hypothyroidism was diagnosed based on consistent clinical signs, laboratory findings, total T₄ (TT₄) < 13nmol/L and cTSH > 0.38 ng/ml; in dogs with normal cTSH, a rhTSH stimulation test was performed to confirm the diagnosis. DNTI were sick dogs with clinical suspicion of hypothyroidism in which hypothyroidism was excluded upon a negative result of a rhTSH stimulation test. SD were diagnosed based on alteration of temperature, cardiac and respiratory frequency, differential leukocyte count and C-reactive protein concentration above reference intervals (RI). HD were considered healthy upon history and physical examination. Hormones evaluation were performed with LC-MS/MS on surplus serum stored at -80°C. TT₄ and cTSH were measured using a validated immunoassay (Immulite®). The hormones RI are shown in Table 1.

Table 1

	fT ₄	fT ₃	rT ₃	3,3-T ₂	3,5-T ₂	TT ₄	cTSH
Reference intervals (RI)	12.8-47.8 pmol/L	1.41-5.34 pmol/L	1.23-5.13 pmol/L	0.27-1.02 pmol/L	0.21-1.99 pmol/L	13-51 nmol/L	0.03-0.38 µg/L

The intra-assay coefficient of variation ranged from 8.2% to 13.8% for TT₄ and from 3.8% to 5% for cTSH.

The minimum detectable concentration for TT₄ and cTSH were 6.4 nmol/L and 0.03 µg/L respectively.

LC-MS/MS method have been validated at the San Marco laboratory. Linearity was evaluated across a wide range of concentrations (0.01-50 ng/ml).

Kruskal-Wallis test (non-parametric) or one-way ANOVA (parametric) were used to compare hormones among different groups (DNTI, DWH, SD, HD). A receiving-operating characteristic (ROC) curve was used to determine the area under the curve (AUC) and select the optimum cut-off values to discriminate DWH from DNTI+SD.

RESULTS

Non-significant differences considering signalment, age and body weight were found between groups.

Median TT₄ and fT₄ serum concentrations were significantly higher ($p < 0.001$) in HD compared to DNTI, DWH and SD (Fig. 1 and 2). Median fT₃ serum concentration was significantly lower in DWH and DNTI compared to SD ($p < 0.001$ and $p = 0.0091$, respectively) and HD ($p < 0.001$ and $p = 0.0024$, respectively) (Fig. 3). Median rT₃ serum concentration was significantly lower in DWH compared to SD ($p = 0.0141$) and HD ($p = 0.0128$) (Fig. 4). Median 3,3-T₂ serum concentration was significantly higher in DWH compared to DNTI ($p = 0.0038$) and HD ($p = 0.0447$) (Fig. 5). There were non-significant differences regarding median 3,5-T₂ serum concentrations among the dogs of the four groups. Using the ROC curve analysis to differentiate DWH from DNTI+SD an AUC of 0.86 ($p = 0.003$), 0.76 ($p = 0.009$) and 0.75 ($p = 0.012$) were obtained for fT₃, fT₄ and TT₄, respectively. Values of fT₃ < 0.61 pmol/L better discriminated hypothyroidism with 69% sensitivity (95%CI: 39-91%), 83% specificity (95%CI: 63-95%) and accuracy of 0.86 (95%CI: 0.74-0.98) (Table 2).

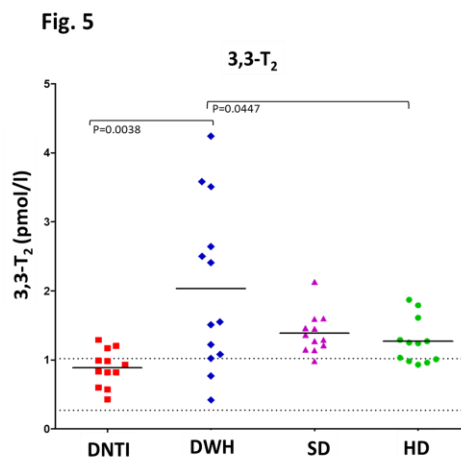
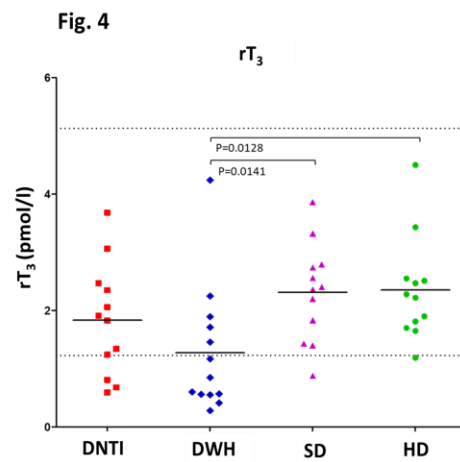
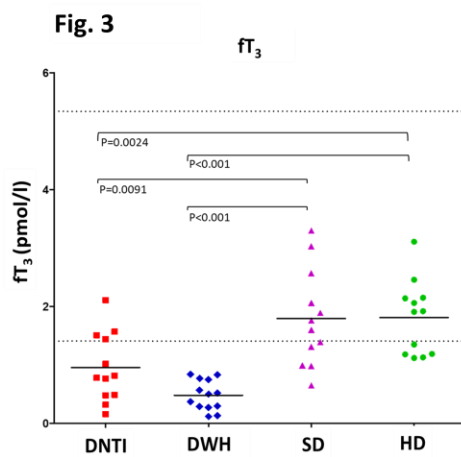
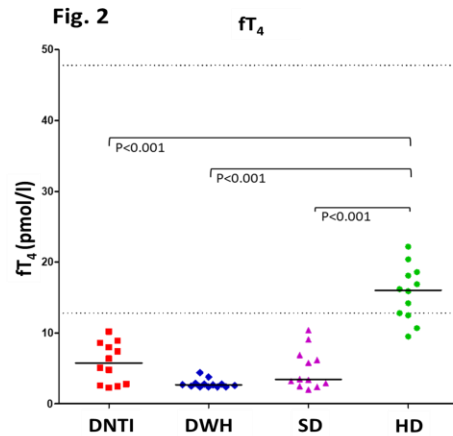
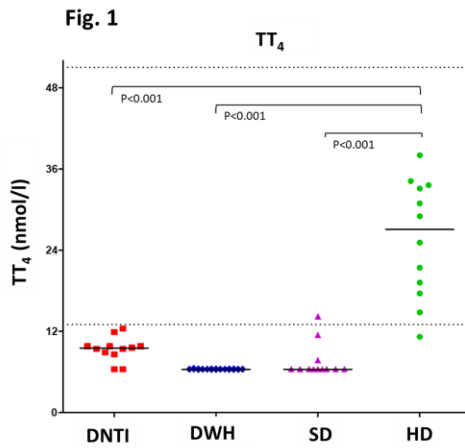


Table 2

	Cutoff	Sensitivity	Specificity	p	Accuracy
fT ₄	<2.75 pmol/L	61.5%	75%	p=0.009	0.76
fT ₃	<0.61 pmol/L	69%	83%	p=0.003	0.86
rT ₃	<1.2 pmol/L	61.5%	83%	p=0.007	0.77
3,3-T ₂	>2.27 pmol/L	46%	100%	p=0.031	0.72
TT ₄	<7.1 nmol/L	100%	54%	p=0.012	0.75

Figure 1-5: Dot plots representing serum concentration of fT₄, TT₄, fT₃, rT₃ and 3,3-T₂ in dogs with non-thyroidal illness (DNTI), dogs with hypothyroidism (DWH), dogs with systemic inflammatory response (SD) and healthy dogs (HD). Short horizontal lines represent the median value of each group, while the long continuous lines shows the parameter's reference range. **Table 2:** Results of the ROC curve analysis of the thyroid hormones used to differentiate DWH from DNTI+SD.

DISCUSSION

Although serum fT_3 and fT_4 (LC-MS/MS) have shown better performances than the serum TT_4 (Immulite®) in identifying DWH, the overlap between DWH and DNTI+SD was unfortunately relevant also for the thyroid hormones measurements with LC-MS/MS. Despite the introduction of new analytical methods, the use of dynamic tests (e.g. rhTSH stimulation test) remains the better method to discriminate DWH from DNTI.

REFERENCES

1. Giunti M, Troia R, Battilani M, *et al.* Retrospective evaluation of circulating thyroid hormones in critically ill dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Science* 18:471-477, 2017.
2. Jonklaas J, Sathasivam A, Wang H, *et al.* 3,3'-diiodothyronine concentrations in hospitalized or thyroidectomized patients: results from a pilot study. *Endocrine Practice* 20:797-807, 2014a.
3. Wu AH and French D. Implementation of liquid chromatography/mass spectrometry into the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 420:4-10, 2013.
4. Thienpont LM, van Uytvanghe K, Poppe K, *et al.* Determination of Free Thyroid Hormones. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism* 27:689-700, 2013.
5. Soldin SJ, Soukhova N, Janicic N, *et al.* The measurement of free thyroxine by isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 358:113-118, 2005.
6. Gu J, Soldin OP and Soldin SJ. Simultaneous quantification of free triiodothyronine and free thyroxine by isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 40:1386-1391, 2007.
7. Yue B, Rockwood AL, Sandrock T, *et al.* Free Thyroid Hormones in Serum by Equilibrium Dialysis and Online Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 54: 642-651, 2008.
8. Wang D and Stapleton HM. Analysis of Thyroid Hormones in Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397:1831-1839, 2010.
9. Tanoue R, Kume I, Yamamoto Y, *et al.* Determination of free Thyroid Hormones in animal serum/plasma using ultrafiltration in combination with ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1539:30-40, 2018.
10. Welsh KJ, Stolze BR, Yu X, *et al.* Assessment of thyroid function in intensive care unit patients by liquid chromatography tandem mass spectrometry methods. *Clinical Biochemistry* 50:318-322, 2017.
11. Gounden V, Jonklaas J and Soldin SJ. A pilot study: Subclinical Hypothyroidism and Free Thyroid Hormone Measurement by Immunoassay and Mass Spectrometry. *Clinical Chimica Acta* 430:121-124, 2014.
12. Welsh KJ and Soldin SJ. Diagnosis of endocrine disease: how reliable are free thyroid and total T3 hormone assays? *European Journal of Endocrinology* 175: 255-263, 2016.
13. Jonklaas J, Sathasivam A, Wang H, *et al.* Total and free thyroxine and triiodothyronine: Measurement discrepancies, particularly in inpatients. *Clinical Biochemistry* 47:1272-1278, 2014b.

Capitolo 6

Ipotiroidismo canino: assenza di correlazione fra aspetti clinici e alterazioni clinico-patologiche

F. Lunetta, G. Carotenuto, F. Fracassi, S. Corradini

Veterinaria 2019; 33(3):171-178

RIASSUNTO

Introduzione: La diagnosi di ipotiroidismo nel cane è spesso complessa e si basa sull'interpretazione combinata degli aspetti clinici e clinico-patologici di base in associazione a test specifici. Non sono presenti in letteratura studi che abbiano comparato l'entità del quadro clinico con le alterazioni clinico-patologiche della malattia. Un precedente studio condotto su cani con ipotiroidismo indotto sperimentalmente ha evidenziato la progressiva riduzione nel tempo della concentrazione sierica di tireotropina (cTSH). Tali soggetti, nel corso dei mesi e degli anni successivi all'induzione della malattia, sviluppavano evidente sintomatologia clinica e alterazioni clinico-patologiche. È pertanto ipotizzabile che i cani affetti da ipotiroidismo spontaneo sviluppino, nel corso del tempo, alterazioni cliniche e clinico-patologiche più gravi associate ad una concentrazione sierica di cTSH nella norma. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare se esista una correlazione tra la gravità dei segni clinici e i risultati delle variabili clinico-patologiche in una popolazione di cani con ipotiroidismo spontaneo.

Materiali e Metodi: I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi in funzione di uno *score* clinico (cani meno sintomatici VS cani maggiormente sintomatici) ed in due ulteriori gruppi in funzione della concentrazione sierica di cTSH (all'interno dell'intervallo di riferimento VS al di sopra dell'intervallo di riferimento). Lo *score* clinico, i parametri emato-chimici e i risultati dei test ormonali sono quindi stati comparati tra i differenti gruppi.

Risultati: I risultati ottenuti dal presente studio non hanno messo in evidenza alcuna differenza significativa dei parametri emato-chimici, dei risultati dei test ormonali e dello *score* clinico tra i diversi gruppi.

Discussione: Sulla base del presente studio è possibile affermare che i cani con ipotiroidismo, ma una concentrazione di cTSH all'interno dell'intervallo di riferimento non presentano sintomatologia clinica più marcata.

ABSTRACT

Introduction: *The diagnosis of canine hypothyroidism is often challenging, and it relies upon a combined interpretation of the clinical condition, the clinicopathological data and hormonal tests. There are no previous studies in literature that compare the severity of the clinical condition with the clinicopathological data of this disease. A previous study involving a group of dogs with experimentally-induced-hypothyroidism showed a progressive reduction in time of thyrotropin (cTSH) serum concentration. These dogs, in the following months and years after the induction of the disease, developed the typical clinical condition and clinicopathological alterations. It is therefore possible that dogs affected by hypothyroidism for a longer period of time present a normal cTSH serum concentration associated with a more severe clinical condition and clinicopathological data related to this endocrine disease. The aim of this study was to evaluate the correlation between the severity of the clinical condition of hypothyroid dogs and clinicopathological data in a population of dogs with spontaneous hypothyroidism.*

Material and Methods: *The patients were subsequently divided into two groups, on the basis of a clinical score (dogs with few clinical signs VS dogs with many clinical signs) and two more groups on the basis of the cTSH serum concentration (within the reference interval VS above the reference interval). The clinical score, the clinicopathological data and the specific hormonal tests were subsequently compared between the different groups.*

Results: *The results of this study did not show any significant difference regarding clinicopathological results, specific hormonal tests and clinical score between the different groups.*

Discussion: *Based on this study, dogs with hypothyroidism and a normal cTSH serum concentration do not have a more severe clinical condition.*

INTRODUZIONE

L'ipotiroidismo primario è una delle più comuni endocrinopatie nel cane e nel 95% dei casi è causato dalla mancata/ridotta produzione di ormoni tiroidei secondariamente ad una tiroidite linfocitica o ad una atrofia idiopatica¹. I segni clinici più comuni sono rappresentati da riluttanza all'esercizio fisico, letargia, aumento di peso e alterazioni dermatologiche^{2,3}. Dal punto di vista emato-chimico le alterazioni risultano poco specifiche, tuttavia la loro presenza può supportare il sospetto di ipotiroidismo in un cane con segni clinici tipici. Anemia normocitica normocromica non rigenerativa, ipercolesterolemia e aumento delle transaminasi epatiche sono le alterazioni clinico-patologiche più comuni. Il protocollo diagnostico per la diagnosi di ipotiroidismo deve includere la valutazione combinata di anamnesi, esame fisico diretto, valutazione del profilo emato-chimico, ovvero la misurazione delle concentrazioni sieriche di colesterolo, trigliceridi e l'attività delle transaminasi, ed indagini ormonali specifiche per la funzionalità tiroidea, ovvero tiroxina totale (T₄), tiroxina libera (fT₄) e tireotropina canina (cTSH). Ad oggi le tecniche considerate *gold standard* per la diagnosi di ipotiroidismo sono l'esame scintigrafico della tiroide⁴ e il test di stimolazione con rhTSH⁵. Entrambe le tecniche sono, tuttavia, disponibili solo presso alcuni centri di referenza e sono inoltre piuttosto costose. Nei pazienti eutiroidei affetti da patologie non tiroidee si può osservare una caratteristica diminuzione della concentrazione sierica degli ormoni tiroidei, la cosiddetta *euthyroid sick syndrome* o *non-thyroidal illness*. In questi soggetti risulta pertanto difficile giungere ad una corretta diagnosi e spesso i cani con *euthyroid sick syndrome* vengono considerati erroneamente ipotiroidei. Circa il 70% dei cani ipotiroidei presenta una concentrazione sierica di cTSH al di sopra dell'intervallo di riferimento normale; tuttavia, circa il 30% dei cani non manifesta tale alterazione⁶. I profili ormonali caratterizzati da ridotte concentrazioni di ormoni tiroidei (T₄ e/o fT₄) associati a normali concentrazioni di cTSH sono ovviamente quelli di più difficile interpretazione. In tali casi risulta difficile discriminare fra ipotiroidismo ed *euthyroid sick syndrome*. Uno studio in cui l'ipotiroidismo era stato sperimentalmente indotto ad un gruppo di cani ha dimostrato come tali soggetti, nei mesi immediatamente successivi all'induzione, presentassero un caratteristico aumento della concentrazione plasmatica di cTSH. Nell'arco dei tre anni seguenti, nonostante non fossero stati trattati con levotiroxina, era stata osservata una progressiva riduzione della concentrazione di cTSH, fino al raggiungimento di valori simili a quelli di un cane eutiroideo⁷. Si è pertanto ipotizzato che, in corso di ipotiroidismo, la persistente stimolazione delle cellule

tireotrope ipofisarie determini, tramite *feedback* negativo, una progressiva desensibilizzazione dei recettori ipofisari del TRH e una conseguente diminuzione della secrezione del cTSH. L'iniziale stimolazione da parte del cTSH promuoverebbe, inoltre, la mitosi di cellule tireotrope pre-esistenti, determinando una minore differenziazione delle cellule staminali e portando così allo sviluppo di cellule tireotrope non-secernenti⁷. Pertanto, se ciò fosse vero, i soggetti ipotiroidei con cTSH normale, essendo malati da più tempo, se non sottoposti a terapia, dovrebbero presentare un quadro clinico e clinico-patologico più marcato rispetto ai cani ipotiroidei con elevate concentrazioni di cTSH. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la presenza di una possibile correlazione tra la gravità della condizione clinica dei pazienti ipotiroidei, le variabili emato-chimiche e le concentrazioni di cTSH sieriche.

MATERIALI E METODI

In questo studio retrospettivo sono stati inclusi cani con diagnosi di ipotiroidismo portati in visita presso l'Ospedale Veterinario Universitario (OVU) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna (DIMEVET) dal 2006 al 2018. Tutte le misurazioni delle variabili clinicopatologiche sono state svolte presso il laboratorio CLINLAB del DIMEVET. La diagnosi di ipotiroidismo è stata raggiunta attraverso la valutazione dell'anamnesi, esame fisico diretto, alterazioni emato-chimiche di base e valutazioni della concentrazione ormonale ed è stata confermata quando si evidenziava una delle seguenti condizioni:

- $T_4 < 13$ nmol/L (intervallo di riferimento 13-51 nmol/L) e cTSH $> 0,38$ ng/ml (intervallo di riferimento 0,03-0,38 ng/ml);
- T_4 post rhTSH < 20 nmol/L o $< 1,5$ volte il T_4 basale;
- Entrambe le condizioni precedenti.

Sono stati esclusi dalla popolazione presa in esame cani con evidenti patologie concomitanti (es. neoplasie, gravi infezioni, sindrome di Cushing) che avrebbero potuto influenzare i risultati dei test endocrini (*euthyroid sick syndrome*).

I valori di riferimento per le determinazioni ormonali sono stati quelli stabiliti dal laboratorio nel quale sono state effettuate le analisi. Per i risultati del test di stimolazione con rhTSH sono stati invece presi come riferimento i valori stabiliti in letteratura⁸.

Tabella 1 - Principali segni clinici valutati nel gruppo di 68 pazienti ipotiroidei. Ai segni clinici “alopecia sulla coda”, “iperpigmentazione canna nasale” e “mixedema facciale” è stato assegnato il punteggio di 2; agli altri segni clinici è stato dato il punteggio di 1

Segni/Sintomi	Punteggio	Segni/Sintomi	Punteggio
Letargia	1	Bradycardia/aritmia	1
Ottundimento del sensorio	1	Costipazione/diarrea	1
Astenia	1	Megaesofago	1
Aumento di peso	1	Otite esterna	1
Intolleranza al freddo	1	Mixedema facciale	2
Alopecia sul corpo	1	Neuropatia periferica/miopia	1
Alopecia sulla coda	2	Sindrome vestibolare periferica	1
Mantello alterato/ ipercheratosi dei cuscinetti/iperpigmentazione su corpo	1	Paralisi del trigemino	1
Iperpigmentazione della canna nasale	2	Crisi convulsive	1
Seborrea/ piodermite	1	Mixedema coma	1
Comportamento alterato	1	Deposito lipidico corneale	1
Cambio della voce	1	Problemi riproduttivi	1

Al fine di classificare la gravità del quadro clinico è stato ideato uno specifico *score clinico*, assegnando un punteggio a ciascuna alterazione clinica riscontrata in anamnesi e all’esame fisico. In particolare, come specificato nella Tabella 1, è stato assegnato un punteggio di 1 alle alterazioni cliniche compatibili con l’ipotiroidismo (letargia, ottundimento del sensorio, astenia, aumento di peso, intolleranza al freddo, alopecia sul corpo, alterazioni del mantello, seborrea o piodermite, alterazioni comportamentali, cambio della voce, bradicardia o aritmia, costipazione o diarrea, megaesofago, otite esterna, neuropatia periferica o miopia, sindrome vestibolare periferica, paralisi del trigemino, crisi convulsive, mixedema coma, deposito lipidico corneale e problemi riproduttivi), il punteggio di 2, invece, è stato assegnato ai segni clinici estremamente indicativi di ipotiroidismo (iperpigmentazione della canna nasale, alopecia della coda, mixedema facciale). Lo *score clinico* è risultato dalla somma dei punteggi assegnati a ciascun paziente.

I cani sono stati successivamente divisi in due gruppi:

- 1) *Low Clinical Score Group* (LCS) con *score* ≤ 5 ossia i cani meno sintomatici;
- 2) *High Clinical score Group* (HCS) con *score* > 5 ossia i cani più sintomatici.

Il test di stimolazione con rhTSH è stato eseguito mediante valutazione delle concentrazioni di T₄ su un campione di siero collezionato prima e dopo 6 ore (T₄ post-stimolazione) dalla somministrazione endovenosa di 75µg di rhTSH (Thyrogen[®], Sanofi Genzyme, Cambridge).

Tutte le valutazioni emato-chimiche sono state effettuate presso il laboratorio di riferimento tramite utilizzo degli analizzatori Siemens ADVIA[®] 2120 (Siemens Healthcare Diagnostic, Tarrytown, NY, USA), Olympus[®] AU400 (Olympus/Beckam Coulter, Brea, California, USA) e Beckman Coulter[®] AU480 (Olympus/Beckman Coulter, Brea, CA, USA), che sono stati utilizzati nel laboratorio di riferimento in successione temporale.

Le determinazioni di T₄ sono state eseguite presso il laboratorio di riferimento tramite tecnica di estrazione in fase solida abbinata alla tecnica immunoenzimatica di chemiluminescenza (Immulite 2000[®], Siemens Healthcare Diagnostic, Flanders, NJ, USA; Canine Total T₄, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). I coefficienti di variazione *intra-assay* erano 5,9% e 5,3% a concentrazioni di T₄ di 8,75 e 146,7 nmol/L, rispettivamente, come riportato dai produttori dell'analizzatore.

La determinazione della concentrazione sierica di cTSH è stata effettuata presso il laboratorio di riferimento tramite tecnica di estrazione in fase solida abbinata alla tecnica immunoenzimatica di chemiluminescenza effettuata in due siti (Immulite 2000[®], Siemens Healthcare Diagnostic, Flanders, NJ, USA; Canine TSH, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). I coefficienti di variazione *intra-assay* erano 5,0%, 4,7% e 5,7% a concentrazioni di cTSH di 0,2, 2,35 e 6,1 ng/mL, rispettivamente, come riportato dai produttori dell'analizzatore.

Tramite la valutazione della concentrazione sierica di cTSH sono stati creati due gruppi, sulla base dei valori utilizzati presso il laboratorio di riferimento:

- 1) cTSH al di sopra dell'intervallo di riferimento, se >0,38 ng/ml;
- 2) cTSH all'interno dell'intervallo di riferimento, se 0,03-0,38 ng/ml.

Si è quindi valutato se fra questi due gruppi vi fossero differenze in merito a peso o età dell'animale, *score* clinico, parametri emato-chimici di base, ovvero il valore ematocrito (Hct), la concentrazione sierica del colesterolo, dei trigliceridi, del calcio totale e del T₄, l'attività

sierica del lattato deidrogenasi (LDH), dell'alanina aminotransferasi (ALT), dell'aspartato aminotransferasi (AST) e della fosfatasi alcalina (ALP).

Le stesse comparazioni, con l'aggiunta della concentrazione sierica di cTSH, sono state inoltre effettuate suddividendo i soggetti sulla base dello score clinico (HCS e LCS).

L'analisi statistica è stata eseguita mediante l'utilizzo del software commerciale GraphPad Prism 5.0. La distribuzione dei dati è stata valutata tramite l'utilizzo del test di D'Agostino e Pearson, permettendo di distinguere le variabili con distribuzione normale, espresse come media \pm deviazione standard, dalle variabili distribuite in modo non normale, espresse come mediana (max-min).

Nelle comparazioni fra i gruppi è stato utilizzato il test t di Student, per dati parametrici, o il test di Mann-Whitney per dati non parametrici.

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

RISULTATI

80

Sessantotto cani ipotiroidei sono stati inclusi nel presente studio. L'età media era di 7,4 anni ($\pm 3,2$) (Figura 1); 33 cani (49%) erano maschi (di cui 30 interi e 3 castrati) e 35 (51%) erano femmine (di cui 13 intere e 22 sterilizzate) (Figura 2); il peso corporeo medio era di 29,1 Kg ($\pm 14,15$).

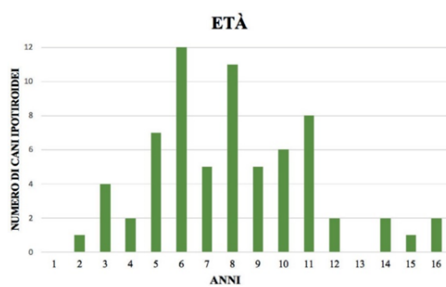


Figura 1 – Istogramma rappresentativo della distribuzione dell'età dei soggetti ipotiroidei inclusi nello studio.

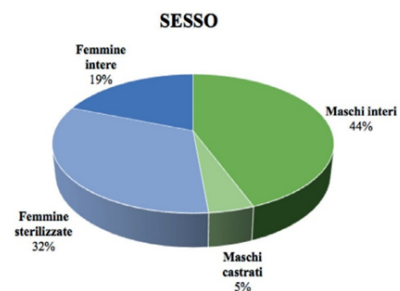


Figura 2 - Distribuzione del sesso della popolazione di cani ipotiroidei.

I cani appartenevano a 28 razze diverse tra cui: 21 meticci, 5 Pastore Tedesco, 4 Labrador Retriever, 4 Setter Inglese, 3 Dobermann Pinscher, 3 Cane da Pastore Maremmano Abruzzese, 3 Segugio Italiano a pelo raso, 2 di ciascuna delle seguenti razze: Setter Irlandese, Beagle,

Dogue de Bordeaux, Lagotto Romagnolo e 1 di ciascuna delle seguenti razze: Rottweiler, Épagneul Breton, Pinscher Tedesco, Hovawart, Cane da Pastore Belga, Bull Terrier, Cane Corso Italiano, Cane da Pastore Svizzero Bianco, Schnauzer Medio, Dogo Argentino, Pointer Inglese, Deutscher Boxer, American Pit Bull Terrier, Tibetan Terrier, Cocker Americano, Spitz Tedesco e American Staffordshire Terrier.

Nella Tabella 2 sono riportate le alterazioni riscontrate agli esami emato-chimici effettuati nel gruppo di cani ipotiroidei al momento della diagnosi.

Tabella 2 – Alterazioni riscontrate agli esami emato-chimici nel gruppo di cani ipotiroidei				
Alterazioni emato-biochimiche	Media (\pmDS) o Mediana (minimo-massimo)	Intervallo di riferimento (unità di misura)	Numero di soggetti nei quali il dato era disponibile	% di soggetti che presentavano tale alterazione
Anemia normocitica normocromica non rigenerativa	37,7 % (\pm 5,6)	37-55%	60/68	48%
Ipercolesterolemia	564 mg/dl (219-1339)	140-350 mg/dl	59/68	95%
Ipertrigliceridemia	195 mg/dl (41-1231)	30-120 mg/dl	33/68	79%
Aumento del lattato deidrogenasi (LDH)	559 UI/L (\pm 460)	30-130 UI/L	13/68	100%
Aumento dell'aspartato aminotransferasi (AST)	41,5 UI/L (20-202)	20-42 UI/L	60/68	48%
Aumento della alanina aminotransferasi (ALT)	64 UI/L (10-491)	20-55 UI/L	61/68	54%
Aumento della fosfatasi alcalina (ALP)	144,5 UI/L (13-1794)	42-180 UI/L	58/68	43%
Ipercalcemia	10,4 mg/dl (\pm 0,7)	9-11,8 mg/dl	56/68	0%

La concentrazione sierica di T₄ è stata valutata in tutti i 68 cani. Tutti i soggetti presentavano una diminuita concentrazione di questo ormone con valore mediano di 6,4 nmol/L (6,4-8,8).

La concentrazione sierica di cTSH è stata valutata in tutti i 68 cani e il valore mediano è risultato essere 0,77 ng/ml (0,03-11,9) (Figura 3). Il 72% dei soggetti ipotiroidei presentava un aumento della concentrazione sierica di cTSH.

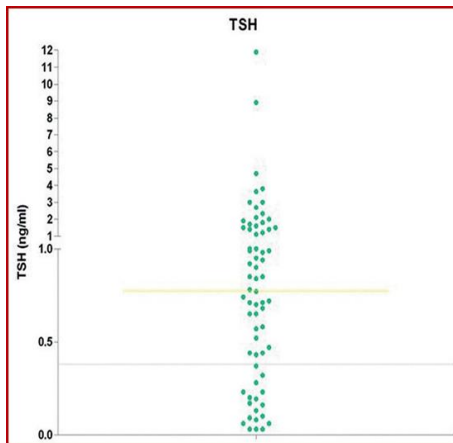


Figura 3 - Dot plot rappresentativo della concentrazione sierica di cTSH misurato nella popolazione di 68 cani ipotiroidei. La linea orizzontale gialla rappresenta la concentrazione mediana del gruppo di studio. La linea orizzontale grigia delimita il limite superiore dell'intervallo di riferimento per questo parametro.

La concentrazione sierica di T_4 post-stimolazione è stata valutata in 32/68 cani (47%). Tutti i soggetti ipotiroidei presentavano una riduzione della concentrazione di questo ormone con valore mediano di 6,4 nmol/L (6,4-16,2 nmol/L).

82

In 58/68 cani ipotiroidei è stato possibile valutare lo *score* clinico; 10/68 cani, appartenenti al gruppo con cTSH sierico aumentato, sono stati esclusi dalla valutazione di tale *score* poiché le cartelle cliniche non erano adeguatamente compilate alla diagnosi.

I principali segni clinici evidenziati nei cani ipotiroidei sono riportati nella Tabella 3.

La media dei punteggi dello *score* clinico calcolato sui pazienti ipotiroidei è stata di 5,2 ($\pm 2,2$). Il 41% (24/58) dei pazienti presentava uno *score* clinico elevato (> 5) (HCS) mentre il 59% (34/58) presentava uno *score* clinico basso (≤ 5) (LCS) (Figura 4).

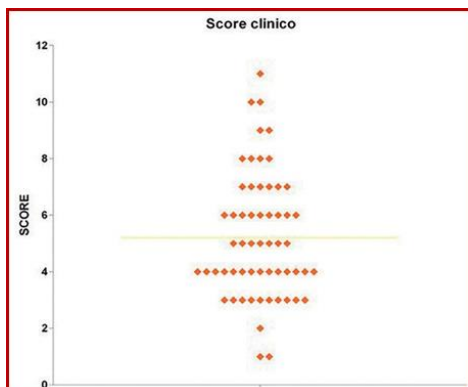


Figura 4 - Dot plot dei valori dello *score* clinico calcolato nella popolazione di 58 cani ipotiroidei. La linea orizzontale gialla rappresenta il valore mediano del gruppo di studio.

Tabella 3 - Principali segni clinici e sintomi riscontrati nel gruppo di 58 cani ipotiroidei

Apparato/Sistema	Segni/Sintomi
Metabolico	<ul style="list-style-type: none"> . Astenia e riluttanza all'esercizio (48%) . Aumento di peso (46%) . Letargia (41%) . Intolleranza al freddo (33%) . Mixedema facciale (14%) . Coma mixedematoso (3%)
Dermatocutaneo	<ul style="list-style-type: none"> . Aree alopeciche simmetriche e non pruriginose sul corpo (55%) . Iperpigmentazione diffusa di tronco/addome, cute forforosa, ipercheratosi dei cuscinetti plantari (53%) . Alopecia della coda (40%) . Iperpigmentazione dorsale della canna nasale (9%) . Seborrea (2%) . Pioderma (2%)
Neuromuscolare	<ul style="list-style-type: none"> . Neuropatia periferica/miopia (26%) . Ottundimento del sensorio (21%) . Cambio della sonorità dell'abbaiato (17%) . Sindrome vestibolare periferica (5%) . Crisi convulsive (3%) . Modificazioni comportamentali (2%) . Diminuzione dei riflessi spinali (2%)
Cardiovascolare	<ul style="list-style-type: none"> . Bradicardia (15%) . Aritmia (2%)
Riproduttivo	<ul style="list-style-type: none"> . Testicoli piccoli, anestro prolungato, galattorrea (12%)
Gastroenterico	<ul style="list-style-type: none"> . Costipazione (5%) . Diarrea (2%)

I risultati della comparazione fra cani con cTSH sierico al di sopra dell'intervallo di riferimento (n=50) e quelli con cTSH all'interno dell'intervallo di riferimento (n=18) è riportata in Tabella 4. Fra i due gruppi non è emersa alcuna differenza significativa.

Nessuna differenza significativa è emersa tra età, peso, alterazioni emato-chimiche ed ormonali tra i due gruppi HCS e LCS (Tabella 5).

Tabella 4 - Confronto tra peso, età, *score* clinico, parametri emato-chimici e ormonali indicativi di ipotiroidismo tra il gruppo di cani con cTSH al di sopra dell'intervallo di riferimento (>0,38 ng/ml) e cTSH all'interno dell'intervallo di riferimento (0,03-0,38 ng/ml).
Nelle colonne 2 e 3 sono riportate la media (\pm DS) o la mediana (valore minimo e valore massimo) dei vari parametri. Nella colonna 3 è riportato il risultato del *p* value

Parametro	cTSH Elevato	cTSH Normale	<i>p</i>
Ematocrito	38,4% (\pm 5,74)	36,1% (\pm 5,2)	0,165
Colesterolo	552 mg/dl (\pm 229)	562 mg/dl (\pm 255)	0,890
Trigliceridi	194 mg/dl (41 - 1231)	244 mg/dl (66 - 1032)	0,919
AST	42 UI/L (23 - 202)	37 UI/L (20 - 176)	0,393
ALT	54 UI/L (10 - 491)	69 UI/L (20 - 320)	0,182
ALP	118 UI/L (24 - 1794)	232 UI/L (13 - 1194)	0,452
Calcio	10,4 mg/dl (\pm 0,59)	10,26 mg/dl (\pm 0,89)	0,388
T ₄	6,4 nmol/L (6,4 - 8,8)	6,4 nmol/L (6,4 - 6,5)	0,534
Score clinico	5,37 (\pm 2,3)	4,8 (\pm 1,9)	0,393
T ₄ post- stimolazione	6,4 nmol/L (6,4 - 16,2)	6,4 nmol/L (6,4 - 10,9)	0,709
Peso	30,3 kg (\pm 13,7)	26,1 kg (\pm 15,2)	0,202
Età	7,4 anni (\pm 3)	7,6 anni (\pm 3,7)	0,820

84

Tabella 5 - Confronto tra peso, età, parametri emato-chimici ed ormonali indicativi di ipotiroidismo tra il gruppo di cani ipotiroidei *high clinical score* (HCS) ed il gruppo *low clinical score* (LCS).
Nelle colonne 2 e 3 sono riportate la media (\pm DS) o la mediana (valore minimo e valore massimo) dei vari parametri. Nella colonna 3 è riportato il *p* value

Parametro	Cani ipotiroidei HCS	Cani ipotiroidei LCS	<i>p</i>
Ematocrito	36,4% (\pm 5,2)	38,1% (\pm 5,8)	0,260
Colesterolo	554 mg/dl (321-748)	565 mg/dl (219-1339)	0,538
Trigliceridi	195 mg/dl (41-859)	218 mg/dl (47-1231)	0,674
LDH	647 UI/L (\pm 685)	523 UI/L (\pm 310)	0,697
AST	41 UI/L (27-133)	43 UI/L (20-202)	0,336
ALT	64 UI/L (10-491)	67 UI/L (18-275)	0,894
ALP	76 UI/L (13-551)	179 UI/L (39-1478)	0,069
Calcio	10,6 mg/dl (\pm 0,65)	10,2 mg/dl (\pm 0,68)	0,102
T ₄	6,4 nmol/L (6,4-6,5)	6,4 nmol/L (6,4-8,8)	0,483
cTSH	0,695 ng/ml (0,06-8,9)	0,725 ng/ml (0,03-3)	0,608
T ₄ post stimolazione	6,4 nmol/L (6,4-6,5)	6,4nmol/L (6,4-16,2)	0,324
Peso	29,2 kg (\pm 14,7)	29,1 kg (\pm 14,9)	0,980
Età	7 anni (\pm 2,8)	7,8 anni (\pm 3,6)	0,347

DISCUSSIONE

Per quanto riguarda le razze, il gruppo maggiormente rappresentato è risultato essere quello dei meticci (30%), seguito dal cane da Pastore Tedesco (7%), Setter Inglese (6%), Labrador Retriever (5%), Segugio Italiano a pelo raso (4%) e Cane da Pastore Maremmano Abruzzese (4%). Tale riscontro si discosta in parte da quanto evidenziato in studi precedenti in cui è descritta una maggiore predisposizione per Golden Retriever e Doberman Pinscher^{6,9,10,11}. È presumibile che la diversa prevalenza delle razze di cani ipotiroidei riscontrata in questo studio possa essere dovuta alla differente localizzazione geografica rispetto agli studi precedentemente svolti.

La prevalenza dei segni clinici riscontrati nei cani ipotiroidei è concorde a quella riportata in letteratura: l'84% dei pazienti presentava segni dermatologici indicativi di ipotiroidismo, il 46% era affetto da una condizione di sovrappeso, il 41% da letargia, il 15% da bradicardia e il 5% dei cani presentava dei sintomi neurologici riconducibili ad una polineuropatia periferica¹². Il riscontro di debolezza (48%), polineuropatia periferica/miopia (26%) e alterazioni dell'apparato riproduttivo (12%) sono maggiormente rappresentati rispetto a quanto riportato in precedenti studi^{12,13}.

Per quanto riguarda le alterazioni clinico-patologiche, nel 48% dei cani inclusi in questo studio si evidenziava anemia normocitica normocromica non rigenerativa e tale percentuale è paragonabile a quella riscontrata in precedenti studi^{12,14}. Analogamente a quanto riportato in letteratura, è stato evidenziato un aumento delle concentrazioni sieriche di colesterolo, trigliceridi e dell'attività enzimatica di AST, ALT e ALP^{12,13}.

Un valore di T₄ al di sotto dell'intervallo di riferimento associato ad aumento della concentrazione sierica di cTSH è stato riscontrato nel 72% dei pazienti inclusi nello studio: tale prevalenza è paragonabile a quanto riportato nei precedenti studi, in cui la percentuale di cani ipotiroidei che presentavano una diminuita concentrazione sierica di T₄ e un'aumentata concentrazione sierica di cTSH è risultata essere del 76%⁶ e del 62%¹¹, rispettivamente.

Nessuna differenza è stata riscontrata tra il gruppo di cani ipotiroidei HCS e LCS per quanto riguarda età, peso, risultati delle variabili clinico-patologiche e concentrazioni sieriche di T₄ e cTSH. La presenza di uno *score* clinico elevato non sembra pertanto correlarsi con le alterazioni emato-chimiche indicative di ipotiroidismo e nemmeno con i risultati dei test

ormonali specifici. Il riscontro di segni clinici, tuttavia, può risultare utile al fine di aumentare il sospetto di ipotiroidismo in soggetti in cui le alterazioni emato-chimiche e le concentrazioni ormonali non siano particolarmente suggestive della disendocrinia.

Nonostante un precedente studio abbia dimostrato che i cani ipotiroidei con concentrazioni di cTSH all'interno dell'intervallo di riferimento risultino probabilmente malati da più tempo rispetto ai cani con cTSH aumentato⁷, i risultati del presente lavoro non hanno messo in evidenza alcuna differenza significativa fra i due gruppi per quanto riguarda la gravità della condizione clinica.

Da questo studio non emergono differenze significative per quanto riguarda età, peso, alterazioni emato-chimiche e valori ormonali (T₄) tra il gruppo di cani ipotiroidei con concentrazioni sieriche di cTSH al di sopra dell'intervallo e all'interno dell'intervallo di riferimento. Non è stata quindi confermata l'ipotesi iniziale, ovvero la presenza di una relazione inversa tra l'entità dei sintomi clinici e le concentrazioni sieriche di cTSH. Possiamo quindi affermare che i pazienti con ipotiroidismo, ma concentrazioni di cTSH all'interno dell'intervallo di riferimento non presentino sintomatologia clinica ed alterazioni clinico-patologiche più evidenti rispetto ai soggetti con cTSH sierico al di sopra dell'intervallo di riferimento.

CONCLUSIONI

Il presente studio non ha permesso di identificare una correlazione tra entità della sintomatologia clinica e i risultati delle variabili clinico-patologiche suggestive di ipotiroidismo.

BIBLIOGRAFIA

1. Mooney CT. Canine Hypothyroidism. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E. Ed. Textbook of Veterinary Internal Medicine, 8th ed. St Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2017, pp. 4198-4227.
2. Greco DS, Rosychuk RA, Ogilvie GK *et al.* The effect of levothyroxine treatment on resting energy expenditure of hypothyroid dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12:7–10, 1998.
3. Scott-Moncrieff JC. Hypothyroidism. In: Feldman EC, Nelson RW, Reusch CE, Scott-Moncrieff JC. Ed. Canine and Feline Endocrinology, 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2015, pp. 77-135.
4. Diaz-Espiñeira MM, Mol JA, Peeters ME *et al.* Assessment of thyroid function in dogs with low plasma thyroxine concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21:25–32, 2007.
5. Daminet S, Fifle L, Paradis M *et al.* Use of recombinant human thyroid-stimulating hormone for thyrotropin stimulation test in healthy, hypothyroid and euthyroid sick dogs. *The Canadian Veterinary Journal* 48:1273-1279, 2007.
6. Peterson ME, Melián C, Nichols R. Measurement of serum total thyroxine, triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations for diagnosis of hypothyroidism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211:1396–1402, 1997.
7. Diaz-Espiñeira MM, Mol JA, van den Ingh TS *et al.* Functional and morphological changes in the adenohypophysis of dogs with induced primary hypothyroidism: loss of TSH hypersecretion, hypersomatotropism, hypoprolactinemia, and pituitary enlargement with transdifferentiation. *Domestic Animal Endocrinology* 35:98–111, 2008.
8. Scott-Moncrieff JC, Nelson RW. Change in serum thyroid-stimulating hormone concentration in response to administration of thyrotropin-releasing hormone to healthy dogs, hypothyroid dogs, and euthyroid dogs with concurrent disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213:1435-1438, 1998.
9. Panciera DL. Hypothyroidism in dogs: 66 cases (1987-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204:761–767, 1994.
10. Ramsey IK, Evans H, Herrtage ME. Thyroid-stimulating hormone and total thyroxine concentrations in euthyroid, sick euthyroid and hypothyroid dogs. *Journal of Small Animal Practice* 38:540–545, 1997.
11. Scott-Moncrieff JC, Nelson RW, Bruner JM *et al.* Comparison of serum concentrations of thyroid-stimulating hormone in healthy dogs, hypothyroid dogs, and euthyroid dogs with concurrent disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 212:387–391, 1998.
12. Panciera DL. Conditions associated with canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 31:935–950, 2001.
13. Dixon RM, Reid SW, Mooney CT. Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Veterinary Record* 145:481–487, 1999.
14. Kaelin S, Watson ADJ, Church DB. Hypothyroidism in the dog: a retrospective study of sixteen cases. *Journal of Small Animal Practice* 27:533–539, 1986.

Capitolo 7

Symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with hypothyroidism before and after treatment with levothyroxine

A. Di Paola, G. Carotenuto, F. Dondi, S. Corradini, F. Fracassi

Submitted

ABSTRACT

BACKGROUND: Canine hypothyroidism produces a decreased glomerular filtration rate (GFR) but this condition is rarely associated with serum creatinine (sCr) concentrations above the reference interval (RI).

Symmetric dimethylarginine (SDMA) is considered an earlier biomarker for the detection of renal dysfunction and it is resulted strongly correlated with GFR in dogs. In humans, SDMA is significantly higher in hypothyroid compared to healthy people.

OBJECTIVES: To evaluate the SDMA and sCr concentrations in a population of hypothyroid dogs (HD) at the time of diagnosis (T0) and after treatment (T1).

ANIMALS: Twenty-four HD and 24 healthy dogs (control group) were included.

METHODS: Retrospective study. The diagnosis of hypothyroidism was based on consistent clinical signs and laboratory findings, including serum total T₄ and cTSH concentrations below and above the RI, respectively. In dogs with normal cTSH, rhTSH stimulation test was performed to confirm the diagnosis.

RESULTS: Median SDMA concentrations (RI <14 µg/dL) were 11 µg/dL (6-18), 14.5 µg/dL (7-20) and 12 µg/dL (5-16) in healthy dogs, HD at T0 and T1, respectively. SDMA concentrations were significantly higher in HD at T0 in comparison with healthy dogs (P=0.0369) and HD at T1 (P=0.0486). Among HD, 12/24 had SDMA above the RI at T0 and in 5/24 at T1. At T0, 8/24 HD had sCr above the RI (>1.35 mg/dL). sCr concentration was significantly higher in HD at T0 compared to HD at T1 (P= 0.0225) and to healthy dogs (P=0.0323), and in one dog sCr was above the RI at T1.

CONCLUSION AND CLINICAL IMPORTANCE: This study shows that SDMA concentration is frequently increased in HD and normalize after treatment in most of the cases.

1. INTRODUCTION

Thyroid hormones affect the physiology of several organ and systems including the kidney.¹⁻⁴ Thyroid dysfunction influence renal function by both direct renal and pre-renal effects (metabolic, cardiovascular, hemodynamic).³ Decreased cardiac output, increased peripheral vascular resistance, intrarenal vasoconstriction, reduced renal response to vasodilators and decreased activity of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), lead to a decrease in renal blood flow (RBF) during hypothyroidism.⁵⁻¹¹ These mechanisms contribute to decreased GFR and increased serum creatinine concentration (sCr) in experimental animals and in hypothyroid humans.^{3,12-14} Mild increase in sCr concentration are common in hypothyroid humans, occurring in 32-54% of affected individuals and in most cases sCr returns within the reference interval (RI) after treatment with levothyroxine.^{2,15-19} Hypothyroid dogs have a reduction in GFR while sCr concentration has been observed only slightly increased or within the RI.²⁰⁻²²

Symmetric dimethylarginine (SDMA) is a byproduct of intracellular protein metabolism, released into circulation after symmetric methylation of arginine residues and subsequent hydrolysis. SDMA is excreted primarily ($\geq 90\%$) by renal clearance, is not secreted or re-absorbed by the tubules and is less influenced by extrarenal factors unlike sCr. Several studies have demonstrated a strong correlation between SDMA concentration and GFR in humans,²³ dogs,^{24,25} and cats.^{26,27} SDMA is today widely used in assessing the renal function in dogs and it is relevant to know which are the factors that influence its concentrations. Arikan and colleagues (2007) reported higher SDMA concentrations in hypothyroid patients compared with healthy people.²⁸ To the authors knowledge, there are no studies that have evaluated the SDMA concentrations in hypothyroid dogs. The purpose of this study was to evaluate the SDMA along with sCr concentrations in hypothyroid dogs (HD) at the time of diagnosis (T0) and after treatment with levothyroxine (T1) and to compare these results with a control group.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Dogs

Client-owned hypothyroid dogs presented at the Veterinary University Hospital of the University of Bologna, between April 2012 and November 2018, were retrospectively enrolled in the study. Data were obtained through evaluation of the electronic medical records.

Hypothyroidism was suspected based on consistent signalment, history, clinical signs (dermatological abnormalities, lethargy, exercise intolerance, cold intolerance, obesity and/or weight gain) and laboratory findings (mild normocytic normochromic anemia, hypercholesterolaemia and/or hypertriglyceridemia).²⁹ The diagnosis was confirmed with serum total thyroxine (TT₄; RI 1.0-3.97 µg/dL) and serum thyroid stimulating hormone (cTSH; RI 0.03-0.38 ng/ml) concentrations below and above the RI, respectively. In cases in which the TT₄ concentration was low but the cTSH concentration within the reference interval the diagnosis was confirmed by a TSH stimulation test that was performed using a dose of 75 µg/dog IV of recombinant human TSH (rhTSH) (Thyrogen, Genzyme Corp, Haverhill, Suffolk, UK). A TT₄ concentration < 1.6 µg/dL or < 1.5 times of basal TT₄, 6 hours post-rhTSH administration, was considered indicative of hypothyroidism, as reported previously.³⁰

Only dogs with an available follow up after thyroid hormone supplementation were included.

Dogs were excluded from the study if they had concurrent systemic diseases (e.g. insulin-dependent diabetes mellitus, hyperadrenocorticism, hypoadrenocorticism, hepatic failure). In particular, dogs with history, clinical signs and laboratory findings suggestive of kidney disease (acute kidney injury, chronic renal disease or urinary tract obstruction) were excluded. Dogs were not eligible for the inclusion if they had received medications known to affect either thyroid function, renal function, or both, within 6 weeks before inclusion (e.g. antithyroid drugs, glucocorticoids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, trimethoprim-potentiated sulfonamides, antiepileptics, anesthetics, sedatives, tricyclic antidepressant, furosemide, mitotane, penicillins, androgens or dopamine). The presence of azotemia at the time of diagnosis was not considered an exclusion criteria.

A group of healthy dogs was included as control. Dogs were deemed healthy based on an unremarkable client history, physical examination and normal results of the complete blood count (CBC) serum chemistry profile and urinalysis.

2.2 Treatment

Thyroid hormones supplementation included levothyroxine tablet (Canitroid; Eurovet Animal Health B.V., Handelsweg, Netherlands; starting dose 10-15µg/kg q12h PO) or liquid formulation (Leventa; Intervet Inc, Millsboro, Delaware; starting dose 20 µg/kg q24h PO).

2.3 Follow-Up examination

Dogs have been re-evaluated (T1) after at least two weeks of thyroid hormone supplementation and included if there had been an improvement of the clinical signs, and TT₄ were within or mildly above the RI. Follow-up examination included clinical history, physical examination, CBC and chemistry. Blood samples were collected 4 to 6 hours after oral administration of levothyroxine and TT₄ were re-assessed for the evaluation of the thyroid function. Serum creatinine and urea concentrations were always included in the chemistry panel. SDMA was measured subsequently by serum surplus stored in our biobank.

2.4 Analytical Procedures

CBC was performed using an automated hematology system (Advia 2120, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY) and serum chemistry profile was performed using an automated chemistry analyzer (AU480 Beckman-Coulter/Olympus, O'Callaghan's Mills, Ireland).

Serum creatinine and urea were measured using a colorimetric method (Jaffe's reaction and UV kinetic method, respectively). The RI of sCr and urea were obtained from a population of 140 healthy dogs.

Serum cTSH concentration was determined by use of a solid-part, 2-site chemiluminescent enzyme immunometric assay (Immulite 2000 Canine TSH, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA).³¹ The sensitivity of the assay was 0.01 ng/mL.

Serum TT₄ concentration was measured using homologous solid-phase, chemiluminescent enzyme immunoassay (Immulite 2000 Canine total T4, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). The sensitivity of the assay was 0.3 µg/dL.

SDMA concentration was measured in hypothyroid dogs at T0 and at T1 and in the control group from surplus of serum stored at -80°C. Samples were stored for maximum of 6 years before being thawed and sent to IDEXX laboratories for batch analysis of SDMA. The analysis

was performed by a commercially available high-throughput immunoassay (IDEXX SDMA Test; IDEXX Laboratories Inc., One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, USA).³²

2.5 Data Analysis

Statistical analysis was performed with commercial software (Prism 7.0a[®], GraphPad software Inc, San Diego, CA). Normality was assessed graphically and by using the D'Agostino-Pearson test. Nonparametric tests were preferred due to small population number and data distribution. Results were expressed as median and range (minimum-maximum value).

Categorical variables were compared using the Fisher's exact test. Differences between the groups for age, body weight, laboratory results (sCr, SDMA) were compared using the Mann-Whitney U-test. In the HD group, differences in sCr and SDMA concentrations between T0 and T1 were evaluated using the Wilcoxon signed rank test. Spearman rank correlation was used to analyse the degree of correlation between SDMA and the variables sCr concentration, and TT₄ concentration. Values of P < 0.05 were considered significant.

3. RESULTS

94

Twenty-four client-owned hypothyroid dogs fulfilled the inclusion criteria and were enrolled in the study. Median age and median body weight (BW) of hypothyroid dogs at time of diagnosis was 8 years (2.8-15.7) and 26 Kg (7.9-69), respectively. Breeds included mixed-breed (n=9), English Setter (n=2), Irish Setter (n=2), Cane Corso Italiano (n=2), and 1 each of the following: Labrador Retrievers, Cocker Spaniel, Dobermann pinscher, American Staffordshire terrier, Cane da Pastore Maremmano Abruzzese, White Swiss Shepherd, Hovawart, Eurasian dog, and Border Collie. Thirteen out of 24 (54%) were male (5/13 neutered) and 11/24 (46%) were female (8/11 spayed).

Twenty-fourth healthy dogs were included as a control group. Thirteen were mixed-breed dogs and 11 were pure breed dogs (Border Collie, Czechoslovakian wolfdog, Lagotto Romagnolo, Australian Shepherd, American Staffordshire terrier, Épagneul Breton, German Shepherd, Golden Retrievers, Labrador Retrievers, Weimaraner). Mean age and BW were 6 years (0.9-14.4) and 22 Kg (7-42.5), respectively. The control group included 14 males (3/14 neutered) and 10 females (7/10 spayed). Demographic data for both groups are presented in table 1.

Variable (unit)	Hypothyroid dogs	Healthy dogs	P value
Age (years)	8 (2.8-15.7)	6 (0.9-14.41)	0.172
Body weight (kg)	26 (7.9-69)	22 (7-42.5)	0.112
Sex (male/female)	13/11	14/10	>0.9

Table 1. Demographic data and body weight of hypothyroid dogs and healthy dogs. Data are expressed as median (range).

No significant differences were found regarding age, BW and sex distribution between the two groups.

The most common clinical signs of the hypothyroid dogs at T0 included: dermatological abnormalities (83%), weakness/exercise intolerance (58%), hypothermia/cold intolerance (41%), depression (41%), weight gain (41%), and lethargy (21%). At the time of diagnosis, the median hematocrit value was 37.9 % (28.7-49.3) and anemia (hematocrit was below the RI, 37.0-55.0%) was detected in 9 (39%) dogs. The median cholesterol concentration was 554 mg/dL (191-1300) and 22/24 (91%) dogs hypercholesterolemia (cholesterol concentration above the RI, 140–350 mg/dL). Urinalysis showed no signs of bacterial infections and median urinary specific gravity (USG) of hypothyroid dog was 1034 (1020-1060).

At T0 all hypothyroid dogs had serum TT₄ below the RI with a median value of 0.5 µg/dL (0.1-0.5). Median cTSH concentration was 0.92 ng/mL (0.06-8.9) and 20/24 (83%) dogs had increased serum cTSH concentration. The rhTSH stimulation test was performed on 9/24 (37%) hypothyroid dogs. The median pre and post stimulation TT₄ of these dogs was 0.12 µg/dL (0.1- 0.5) and 0.13 µg/dL (0.1-0.5), respectively.

Dogs had been re-evaluated after at least 2 weeks (median 59 days) from thyroid hormone supplementation (T1). All dogs showed a general improvement of the clinical signs and the median TT₄ concentration was 3 µg/dL (1.7-5.7).

Result for CBC, serum chemistry, urinalysis and thyroid hormones are shown in table 2.

Serum urea concentrations was significantly higher at T0, median 39.4 mg/dL (9-86), compared to T1, median 26.6 mg/dL (10-58) (P = 0.0008). At T0 3/24 dogs had a mildly increased in serum urea concentrations and an increase in urea concentration was present only in one dog at T1.

In hypothyroid dogs at T0, median sCr concentrations were 1.22 mg/dL (0.6-2.02) and 8/24 (33%) dogs had an increase in sCr concentration above the RI. Compared to healthy dogs, sCr concentration was significantly increased in hypothyroid dogs at T0 (P = 0.0323). At T1 median sCr concentration was 0.93 mg/dL (0.5-1.4), significantly lower if compared to healthy dogs [1.11 mg/dL (0.87-1.3); P = 0.0108], and only 1/8 dogs had a persistent increase in serum creatinine concentration above the RI. The owner of this dog reported that the clinical signs of hypothyroidism started 2 years before diagnosis so we cannot exclude an irreversible alteration of the kidney function in this case. In hypothyroid dogs, sCr concentration was significantly higher at T0, when compared to T1 result (P = 0.0225) (Figure 1).

Variable (unit)	Hypothyroid dogs (n=24)	RI
HTC (%)	37.9 (28.7-49.3) (n=23)	37-55
MCV (fL)	67.4 (59.9-73.7) (n=23)	60-77
MCHC (gr%)	33.6 (32.2-37) (n=23)	32-38
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	339 (92-957) (n=23)	160-500
Leucocytes (/mm ³)	8140 (5560-24000) (n=23)	6000-17000
Lymphocytes (/mm ³)	1860 (500-6230) (n=23)	1000-4800
Neutrophils (/mm ³)	5285 (3180-11370) (n=23)	3000-12000
Eosinophils (/mm ³)	320 (70-2540) (n=23)	0-750
Monocytes (/mm ³)	435 (230-650) (n=23)	100-1400
ALT (U/L)	50 (14-320) (n=24)	15-65
AST (U/L)	35 (14-73) (n=24)	15-52
ALP (U/L)	69 (13-534) (n=23)	12-180
GGT (U/L)	22 (0.1-3.3) (n=23)	0-5
Cholesterol (mg/dL)	554.5 (191-1300) (n=24)	140-350
Triglycerides (mg/dL)	170 (72-655) (n=13)	30-120
Sodium (mEq/L)	145 (141-153) (n=23)	143-151
Phosphate (mg/dL)	4 (2.27-6.3) (n=22)	2.65-5.4
USG	1034 (1020-1060) (n=17)	>1030
Urinary pH	6.5 (5-8) (n=17)	
TT4 ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	6.4 (1.29-6.4) (n=24)	1-3.97
TSH (ng/mL)	0.92 (0.06-8.9) (n=24)	0.03-0.38

Table 2. Results for CBC, serum chemistry, urinalysis and thyroid hormones of hypothyroid dogs. Data are expressed as median (range). **Abbreviations:** RI, reference interval; HTC, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume, MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyl transferase; CK, creatine kinase; USG, urinary specific gravity; TT4, total thyroxine; TSH, thyroid stimulating hormone

Median serum SDMA concentration of hypothyroid dogs at T0 was 14.5 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (7-20) and 12/24 dogs (50%) had SDMA concentration above the RI. SDMA concentration was

significantly higher in hypothyroid dogs at time of diagnosis compared to healthy dogs [11 $\mu\text{g/dL}$ (6-18); $P = 0.0369$]. At T1, median SDMA concentration was 12 $\mu\text{g/dl}$ (5-16) without a significantly difference if compared to healthy dogs. Three dogs out of 24 that had a serum SDMA concentration within the RI at T0 (11 $\mu\text{g/dL}$, 13 $\mu\text{g/dL}$ and 11 $\mu\text{g/dL}$, respectively), showed an increase at T1 (15 $\mu\text{g/dL}$, 16 $\mu\text{g/dL}$ and 16 $\mu\text{g/dL}$, respectively). At time of diagnosis, hypothyroid dogs had significantly higher serum SDMA concentrations if compared to T1 ($P = 0.0486$) (Figure 2). Results for urea, sCr and SDMA are shown in table 3.

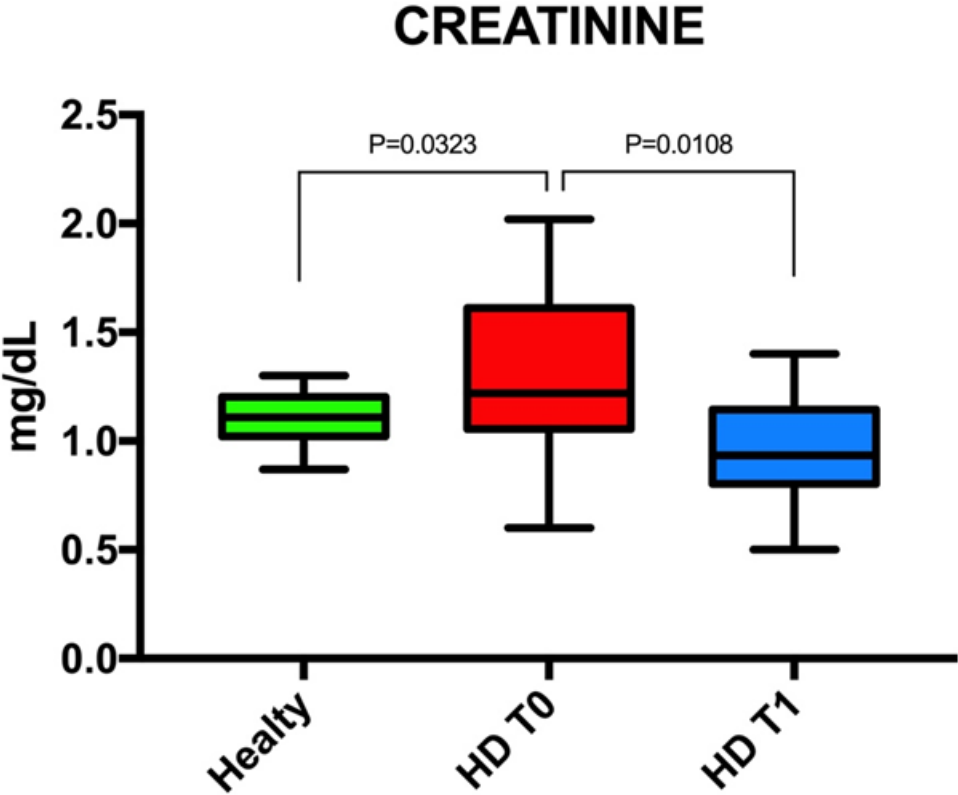


Figure 1. Box plots comparing the medians of serum creatinine concentrations in healthy dogs, hypothyroid dogs at T0 (HD T0) and hypothyroid dogs at T1 (HD T1). The horizontal lines of the box represent the 25th, 50th (median) and the 75th percentiles. Outlying horizontal lines of the box represent minimum and maximum values.

SDMA

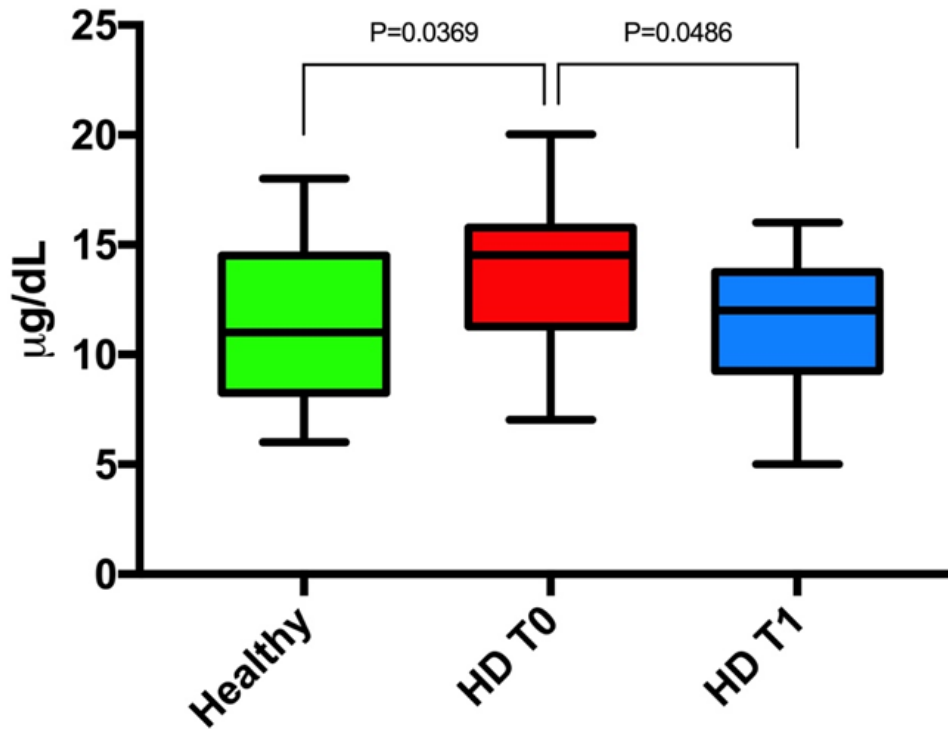


Figure 2. Box plots comparing the medians of SDMA concentrations in healthy dogs, hypothyroid dogs at T0 (HD T0) and hypothyroid dogs at T1 (HD T1). The horizontal lines of the box represent the 25th, 50th (median) and the 75th percentiles. Outlying horizontal lines of the box represent minimum and maximum values.

Variable	Hypothyroid dogs T0	Hypothyroid dogs T1	Healthy dogs	P value		
				Healthy-HD T0	Healthy-HD T1	HD T0-HD T1
SDMA (µg/dL)	14.5 (7-20)	12 (5-16)	11 (6-18)	0.0369	0.677	0.0486
sCr (mg/dL)	1.22 (0.6-2.02)	0.93 (0.5-1.4)	1.11 (0.87-1.3)	0.0323	0.0225	0.0108
Urea (mg/dL)	39.4 (9-86)	26.6 (10-58)				0.0008

Table 3. Median (range) symmetric dimethylarginine (SDMA), serum creatinine (sCr) and urea in hypothyroid dogs at T0, hypothyroid dogs at T1 and healthy dogs. **Abbreviations:** RI, reference interval; HD, hypothyroid dogs; SDMA, symmetric dimethylarginine; sCr, serum creatinine.

The correlation between SDMA and sCr was low and not significant at both times (T0, $r=0.391$; $P=0.0589$; and T1, $r=0.123$; $P=0.566$). Overall, considering both T0 and T1, the two variables showed a weak and significant correlation ($r=0.317$; $P=0.028$). Correlation of sCr with serum TT_4 was not significant at both time points ($r=0.079$, $P=0.712$ at T0; $r=0.055$, $P=0.796$ at T1).

Considering all measurement of serum TT₄ and sCr we found a moderate negative correlation ($r = -0.448$, $P = 0.0014$). No correlation was found at T0 between serum TT₄ and SDMA ($r = -0.393$, $P = 0.057$) but a moderate and significant negative correlation at T1 ($r = -0.487$, $P = 0.015$). Considering both time points serum TT₄ and SDMA showed a moderate negative correlation ($r = -0.458$, $P = 0.001$).

4. DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the effect of hypothyroidism and subsequent hormonal supplementation on renal biomarkers, in particular serum creatinine and SDMA concentration, because it is well recognized that thyroid hormones affects renal function.¹⁻⁴

For this purpose, the concentration of two renal biomarker (sCr and SDMA) were evaluated before (T0) and after (T1) the hormonal supplementation in a population of hypothyroid dogs.

The results showed that in hypothyroid dogs sCr and SDMA concentrations were above the RI in 33% and 50%, respectively. Serum creatinine and SDMA concentrations were significantly higher in HD at the time of diagnosis and, in most of the cases, a normalization after levothyroxine supplementation was observed.

The effects of thyroid hormones on kidney function have been investigated extensively in both humans and rats.¹⁻³ The GFR can be reduced up to 40% in hypothyroid humans and up to 30% in hypothyroid rats.^{2,18,33-35} Gommeren and colleagues (2009), described in 85% of hypothyroid dogs a decreased GFR ($< 2\text{mL/min/Kg}$) although sCr concentration was slightly increased or remained within the RI. In a study on iatrogenic canine hypothyroidism, the reduction in GFR was not associated with a concomitant increase in plasma creatinine concentrations.²² In our study, sCr was above the RI in one third of dogs at T0, in agreement with previous studies,^{20,21} but in contrast to the results reported by Panciera and Lefebvre (2009). The reason for this discrepancy could be related to the different study design (spontaneous hypothyroidism, different number of dogs and different follow-up times); elapsed timing since the development of hypothyroidism could also have influenced the results. Moreover, in our study we used internal laboratory RI established on a population of healthy dogs, in contrast previous studies do not specify how the normal ranges were obtained (i.e. derived from the literature rather than internally established by a laboratory).²⁰⁻

The existence of a curvilinear relationship between GFR and sCr may justify the finding of a low number of azotemic hypothyroid dogs at the time of diagnosis. Indeed, in early renal dysfunction, a large change in GFR is associated with little or no change in plasma creatinine concentration.³⁶ Moreover, endogenous creatinine production was reduced in dogs with induced hypothyroidism and this could mitigate the effect of decreased GFR on plasma creatinine level.²² The cause of lower production of endogenous creatinine is unknown. Panciera and Lefebvre (2009) supposed that, because plasma creatinine is derived primarily from skeletal muscle, it could result from a decrease in the muscle mass in hypothyroid dogs compared to healthy dogs. No studies had investigated this feature, furthermore it would be in contrast to what reported in human hypothyroid patients.^{37,38}

In the current study, sCr was significantly decreased at T1 compared to T0 suggesting an increasing in renal function after hormone supplementation, as previously observed.²¹ Of 8/24 dogs with increased sCr at T0, all but 1 had sCr concentration within the RI at T1. However, also the dog with persistent azotemia showed an improvement in renal function because sCr was significantly reduced from 1.87 mg/dL (T0) to 1.4 mg/dL (T1). The increase of sCr concentrations may occur within two weeks of significant hypothyroidism in people. In humans with normal renal function such concentrations typically normalize rapidly with thyroid hormone replacement after short period of hypothyroidism,^{2,16-18} which is suggestive of only functional renal changes not associated with renal pathological lesions.^{2,15,17,18} However, slower and incomplete recovery has been noted with more prolonged periods of severe hypothyroidism¹⁶ and in our study, the owner of the dog still azotemic at T1, reported that the clinical signs of hypothyroidism started 2 years before the diagnosis. In a previous study on hypothyroid dogs, GFR remained < 2 ml/kg/min in 50% of the dogs after treatment, so irreversible alteration of the kidney function may not be completely excluded.²¹

Serum SDMA concentrations was >14 µg/dL (upper limit of the RI) in 12/24 (50%) dogs at diagnosis, and in 10 (83%) of these dogs it normalized after thyroid hormone supplementation. One of the two dogs with a persistent increased in SDMA concentration had an increased sCr at T0 that normalized at T1, the other one had a normal sCr both at T0 and T1. According to various studies, SDMA, compared to sCr, seems to be an earlier marker of kidney dysfunction and strongly correlated with GFR and sCr concentrations in dogs, cats and humans.^{24-26,39,40} The upper limit of the RI for SDMA corresponds to a reduction of

approximately 49% in GFR, whereas the upper limit of the RI for sCr corresponds to a reduction of approximately 75% from mean GFR in dogs.²⁵ It is therefore possible that in these dogs with a persistent increased in SDMA concentration, decreased GFR persisted despite hormone supplementation, as previously described.²¹ Unexpectedly three dogs that had a serum SDMA concentration within the RI at T0 showed an increase at T1. Serum SDMA intermittently reaches concentrations of 14-15 µg/dL, and rarely up to 16 µg/dL, in dogs unaffected by renal disease, and these increases were found to occur more commonly in young dogs.²⁴ Furthermore, a recent prospective study compared overall diagnostic performance of SDMA and serum cystatin C to sCr, for detection of decreased GFR in clinically stable dogs, with or without CKD. Regarding SDMA, 16 µg/dL was the optimal cut off (SE 90%, SP 87%) for detection of a decreased measured GFR (mGFR). A cut off value of 14 µg/dL was associated with higher sensitivity, but it would result in higher number of false positive results (number of dogs with normal mGFR).⁴¹ In our study we used a cut off value of 14 µg/dL, unfortunately it was not possible to evaluate the trend of SDMA over time, for this reason the clinical relevance of our result remains unclear. Moreover, these dogs were re-evaluated only after one month of therapy, it would have been interesting to be able to evaluate the trend of SDMA over time but unfortunately, we lost their follow-up. Another remark is about basal metabolism that is influenced by thyroid hormones and since SDMA is a byproduct of intracellular metabolism we cannot rule out that hypothyroidism might affect SDMA production. The authors can speculate that lack of thyroid hormones at T0 could determine false negative results (normal SDMA concentration) and the subsequent hormone supplementation could result in mild increment of SDMA without a clinical relevance (false positive). In the study of Buresova and colleagues (2019) serum SDMA was increased before ¹³¹I treatments in 6 of 47 (13%) hyperthyroid cats and normalized after treatment in 4 of those cats.⁴² In the same study serum SDMA concentration was poorly correlated with GFR. Similarly, in another study SDMA normalized after ¹³¹I treatment in 3 of 5 non azotemic cats with increased pre-treatment SDMA.⁴³ In humans, Arikan and colleagues found a significant increase of SDMA concentrations in hypothyroid compared to healthy people. Hyperthyroid patients showed mild and non-significant increment of serum SDMA concentration. Furthermore, the concentrations of SDMA were positively correlated with those of L-arginine, total cholesterol and low-density lipoprotein.²⁸ Moreover, in-vitro study demonstrated the effect of thyroid hormones on L-arginine metabolism.⁴⁴ Consequently, in thyroid dysfunctions

not only the GFR but also changes in protein metabolism could influence serum SDMA concentrations. Further studies on metabolism of SDMA in hypothyroid dogs are needed to investigate this aspect. In our study, the correlation of SDMA with sCr was low and not significant at T0 and T1, in contrast to previous studies which observed high and significant correlation of SDMA with both GFR and sCr in animals and humans.^{23–26,39,45–50} However, considering all the time points together, the SDMA and sCr showed weak and significant correlation ($r=0.317$; $P=0.028$), therefore, the low number of cases might have influenced such results. Moreover, the low sensitivity of sCr concentration in detecting early kidney dysfunction, as opposed to SDMA, could be another reason for this discrepancy.

This study has several limitations; most important GFR measurements were not performed so the renal function has not been fully evaluated. Additionally, inclusion of a larger number of cases, longer follow-up period and serial measurements of sCr and SDMA on the same patient would have permitted to better evaluate the trend of these parameters. A further limit is that serum samples were stored for up to 5 years at -80°C . Previous studies showed high stability of SDMA in canine serum or plasma, resisting to significant change at room (20°C) and refrigerator (4°C) temperatures for 14 days.²⁴ To the authors knowledge there are no published study evaluating the long-term stability of SDMA in frozen serum samples; however, anecdotal evidence supports stability for at least 5 years when frozen at -80°C (IDEXX, Laboratories, Inc., Personal Communication).⁴⁰

5. CONCLUSION

In conclusion, serum SDMA concentration is above the reference interval in 50% of hypothyroid dogs and it normalizes after treatment in most of the cases. Serum creatinine seems to be less sensitive in detecting decreased GFR in HD, being increased in only one third of hypothyroid dogs before hormonal supplementation. Future prospective studies are needed to better understand the performance of SDMA as a biomarker of renal dysfunction in hypothyroid dogs.

REFERENCES

1. Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med.* 1990;88:631-637.
2. den Hollander JG, Wulkan RW, Mantel MJ, Berghout A. Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function. *Clin Endocrinol.* 2005;62:423-427.
3. van Hoek I, Daminet S. Interactions between thyroid and kidney function in pathological conditions of these organ systems: a review. *Gen Comp Endocrinol.* 2009;160:205-215.
4. Scott-Moncrieff JC. Hypothyroidism. In: Feldman EC, Nelson RW, Reusch CE, et al., eds. *Canine and Feline Endocrinology*. 4th ed. St. Louis: Elsevier; 2015:77-135.
5. Gillum DM, Falk SA, Hammond WS, Conger JD. Glomerular dynamics in the hypothyroid rat and the role of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol.* 1987;253:F170-179.
6. Panciera DL. An echocardiographic and electrocardiographic study of cardiovascular function in hypothyroid dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;205:996-1000.
7. Taylor RR, Covell JW, Ross J. Influence of the thyroid state on left ventricular tension-velocity relations in the intact, sedated dog. *J Clin Invest.* 1969;48:775-784.
8. Gold M, Scott JC, Spitzer JJ. Myocardial metabolism of free fatty acids in control, hyperthyroid, and hypothyroid dogs. *Am J Physiol.* 1967;213:239-244.
9. Park CW, Shin YS, Ahn SJ, et al. Thyroxine treatment induces upregulation of renin-angiotensin-aldosterone system due to decreasing effective plasma volume in patients with primary myxoedema. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2001;16:1799-1806.
10. Moreno JM, Wangenstein R, Sainz J, et al. Role of endothelium-derived relaxing factors in the renal response to vasoactive agents in hypothyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E182-188.
11. Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, et al. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol.* 2006;154:197-212.
12. Basu G, Mohapatra A. Interactions between thyroid disorders and kidney disease. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16:204-213.
13. Dousdampanis P, Trigka K, Vagenakis GA, Fourtounas C. The thyroid and the kidney: a complex interplay in health and disease. *Int J Artif Organs.* 2014;37:1-12.
14. Iglesias P, Bajo MA, Selgas R, Díez JJ. Thyroid dysfunction and kidney disease: An update. *Rev Endocr Metab Disord.* 2017;18:131-144.

15. Montenegro J, González O, Saracho R, Aguirre R, González Ó, Martínez I. Changes in renal function in primary hypothyroidism. *Am J Kidney Dis.* 1996;27:195-198.
16. Kreisman SH, Hennessey JV. Consistent reversible elevations of serum creatinine levels in severe hypothyroidism. *Arch Intern Med.* 1999;159:79-82.
17. Villabona C, Sahun M, Roca M, et al. Blood volumes and renal function in overt and subclinical primary hypothyroidism. *Am J Med Sci.* 1999;318:277-280.
18. Karanikas G, Schütz M, Szabo M, et al. Isotopic renal function studies in severe hypothyroidism and after thyroid hormone replacement therapy. *Am J Nephrol.* 2004;24:41-45.
19. Asvold BO, Bjørro T, Vatten LJ. Association of thyroid function with estimated glomerular filtration rate in a population-based study: the HUNT study. *Eur J Endocrinol.* 2011;164:101-105.
20. Dixon RM, Reid SW, Mooney CT. Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Vet Rec.* 1999;145:481-487.
21. Gommeren K, van Hoek I, Lefebvre HP, Benckroun G, Smets P, Daminet S. Effect of thyroxine supplementation on glomerular filtration rate in hypothyroid dogs. *J Vet Intern Med.* 2009;23:844-849.
22. Panciera DL, Lefebvre HP. Effect of experimental hypothyroidism on glomerular filtration rate and plasma creatinine concentration in dogs. *J Vet Intern Med.* 2009;23:1045-1050.
23. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:2446-2451.
24. Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, et al. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Vet Intern Med.* 2015;29:1036-1044.
25. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Almes K, Jewell DE. Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med.* 2016;30:794-802.
26. Braff J, Obare E, Yerramilli M, Elliott J, Yerramilli M. Relationship between serum symmetric dimethylarginine concentration and glomerular filtration rate in cats. *J Vet Intern Med.* 2014;28:1699-1701.
27. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Jewell DE. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2014;28:1676-1683.

28. Arikan E, Karadag CH, Guldiken S. Asymmetric dimethylarginine levels in thyroid diseases. *J Endocrinol Invest.* 2007;30:186-191.
29. Mooney CT. Canine hypothyroidism: A review of aetiology and diagnosis. *N Z Vet J.* 2011;59:105-114.
30. Boretti FS, Sieber-Ruckstuhl NS, Favrot C, Lutz H, Hofmann-Lehmann R, Reusch CE. Evaluation of recombinant human thyroid-stimulating hormone to test thyroid function in dogs suspected of having hypothyroidism. *Am J Vet Res.* 2006;67:2012-2016.
31. Iversen L, Jensen AL, Høier R, Aaes H. Biological variation of canine serum thyrotropin (TSH) concentration. *Vet Clin Pathol.* 1999;28:16-19.
32. Rentko V, Nabity M, Yerramilli M, et al. Determination of serum symmetric dimethylarginine reference limit in clinically healthy dogs [abstract]. *J Vet Intern Med.* 2013;27:750.
33. Suher M, Koc E, Ata N, Ensari C. Relation of thyroid dysfunction, thyroid autoantibodies, and renal function. *Ren Fail.* 2005;27:739-742.
34. Capasso G, De Tommaso G, Pica A, et al. Effects of thyroid hormones on heart and kidney functions. *Miner Electrolyte Metab.* 1999;25:56-64.
35. Katz AI, Lindheimer MD. Renal sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase and sodium reabsorption in the hypothyroid rat. *J Clin Invest.* 1973;52:796-804.
36. Finco DR, Brown SA, Vaden SL, Ferguson DC. Relationship between plasma creatinine concentration and glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 1995;18:418-421.
37. Stangierski A, Ruchała M, Krauze T, Moczko J, Guzik P. Treatment of severe thyroid function disorders and changes in body composition. *Endokrynol Pol.* 2016;67:359-366.
38. Sirigiri S, Vaikkakara S, Sachan A, et al. Correction of Hypothyroidism Leads to Change in Lean Body Mass without Altering Insulin Resistance. *Eur Thyroid J.* 2016;5:247-252.
39. Tatematsu S, Wakino S, Kanda T, et al. Role of nitric oxide-producing and -degrading pathways in coronary endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:741-749.
40. Jepson RE, Syme HM, Vallance C, Elliott J. Plasma asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, L-arginine, and nitrite/nitrate concentrations in cats with chronic kidney disease and hypertension. *J Vet Intern Med.* 2008;22:317-324.
41. Plander L, Häggström J, Larsson A, et al. Comparison of the diagnostic value of symmetric dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med.* 2019; 33:630-639.

42. Buresova E, Stock E, Paepe D, et al. Assessment of symmetric dimethylarginine as a biomarker of renal function in hyperthyroid cats treated with radioiodine. *J Vet Intern Med.* 2019;33:516-522.
43. Peterson ME, Varela FV, Rishniw M, Polzin DJ. Evaluation of Serum Symmetric Dimethylarginine Concentration as a Marker for Masked Chronic Kidney Disease in Cats With Hyperthyroidism. *J Vet Intern Med.* 2018;32:295-304.
44. Toral M, Jimenez R, Montoro-Molina S, et al. Thyroid hormones stimulate L-arginine transport in human endothelial cells. *J Endocrinol.* 2018;239:49–62.
45. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Jewell DE. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2014;28:1676-1683.
46. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Melendez LD, Jewell DE. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *J Vet Intern Med.* 2015;29:808-814.
47. Relford R, Robertson J, Clements C. Symmetric Dimethylarginine: Improving the Diagnosis and Staging of Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2016;46:941-960.
48. Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A, et al. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med.* 2017;31:799-804.
49. Pedersen LG, Tarnow I, Olsen LH, Teerlink T, Pedersen HD. Body size, but neither age nor asymptomatic mitral regurgitation, influences plasma concentrations of dimethylarginines in dogs. *Res Vet Sci.* 2006;80:336-342.
50. Choi B-S, Moon H-S, Seo S-H, Hyun C. Evaluation of serum cystatin-C and symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with heart failure from chronic mitral valvular insufficiency. *J Vet Med Sci.* 2017;79:41-46.

Capitolo 8

Cushing's syndrome— an epidemiological study based on a canine population of 21,281 dogs

*G. Carotenuto¹, E. Malerba¹, C. Dolfini¹, F. Brugnoli², P. Giannuzzi³,
G. Semprini⁴, P. Tosolini⁵, F. Fracassi¹*

Open Veterinary Journal 2019; 9(1):27-32.

¹Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, Bologna 40064, Italy

²Ospedale Veterinario I Portoni Rossi, Zola Predosa, Bologna 40069, Italy

³Ospedale Veterinario Pingry, Bari 70126, Italy

⁴Centro Veterinario Bolognese, Bologna, 40131, Italy

⁵Ambulatorio Veterinario Schiavi, Udine 33100, Italy

ABSTRACT

The epidemiological characteristics of spontaneous hypercortisolism (HC) were derived from 21,281 client-owned dogs selected from four private veterinary clinics and one university reference center for endocrinology. The odds ratio (OR) method was employed to investigate the risk of developing HC related to breed, gender, and sexual status. The estimated prevalence of HC in the four private clinics was 0.20% [95% confidence interval (CI), 0.13–0.27] and was significantly different compared to the university reference center (1.46%; 95% CI, 1.12–1.80). Sex, breed, and age resulted in risk factors for HC. Mean (\pm SD) age for dogs with HC was 9.8 (\pm 2.5) yr. Females had higher risk for HC compared to males (OR 1.85; 95% CI, 1.24–2.75); all neutered dogs (both males and females) had higher risk than intact dogs (OR 2.54; 95% CI, 1.72–3.73); and neutered females had higher risk compared to intact females (OR 2.61; 95% CI, 1.54–4.42). Using the mixed breed dogs as a control population (OR = 1), the risk of developing HC was significantly higher in the Standard Schnauzer (OR 58.1; $p < 0.0001$) and Fox Terrier (OR 20.33; $p < 0.0001$). With regard to HC, this study identified an overall prevalence of 0.20%. The data support the existence of sex predisposition, with the highest risk for neutered females.

INTRODUCTION

Spontaneous hypercortisolism (HC), also known as Cushing's syndrome, is caused by a chronic and pathologic overproduction of cortisol and generally occurs in middle-aged to older dogs (Ling *et al.*, 1979; Ortega *et al.*, 1996; Gallelli *et al.*, 2010). The excess of glucocorticoids causes a combination of physical and biochemical changes that have a considerable impact on the animal's quality of life. HC is either the result of pathological oversecretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) by a functional pituitary tumor (PDH, pituitary-dependent hyperadrenocorticism) or is the consequence of a primary adrenal disorder (ADH, adrenal-dependent HC) (Behrend, 2010). Recently, HC resulting from other causes (e.g., ectopic secretion of ACTH or food-dependent hypercortisolemia) has also been described in dogs but these seem to be rare conditions (Galac *et al.*, 2005; 2008; Castillo *et al.*, 2014). In humans, HC is considered a rare disease with an incidence ranging from 0.7 to 2.4 individuals per million population per year (Ambrosi *et al.*, 1990; Lindholm *et al.*, 2001). Clinical experience shows that

HC is a fairly common endocrinopathy in dogs even if, to our knowledge, there are only a few epidemiological studies published in the literature. In the United States, the incidence of new cases of hyperadrenocorticism is 1 to 2 cases per 1,000 dogs per year, and the prevalence of PDH is estimated around 0.2% (Willeberg and Priester, 1982; Lourenço *et al.*, 2015). A recent study performed in the United Kingdom reported an estimated prevalence of 0.28% for HC (O'Neill *et al.*, 2016). A significant predisposition to HC in older dogs and in some breeds, such as miniature Poodle, Boxer, and Dachshund has been observed (Ling *et al.*, 1979; Jensen *et al.*, 1997; Burkhardt *et al.*, 2013; Fracassi *et al.*, 2015a; Van Rijn *et al.*, 2016). A potential predisposition for female dogs has been reported in some studies (Ortega *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2007; Gallelli *et al.*, 2010) but such studies suffer from the lack of a control population. Because of potential environmental and genetic differences across geography and time, these data may not be translatable to the current worldwide canine population. The aim of this study is to fill in the gaps in our epidemiological knowledge of HC through the analysis of a canine Italian population.

MATERIALS AND METHODS

Data were extracted from client-owned dogs selected from electronic databases of five veterinary clinics for cases matching the search terms “hyperadrenocorticism,” “Cushing’s syndrome,” “PDH/ADH,” or “HC”, between September 2012 and September 2014. The teaching hospital of the Department of Veterinary Medical Science, University of Bologna is a reference center for HC, while the other four 24-h clinics, scattered throughout the Italian territory (four in northern Italy and one in southern Italy) in order to avoid regional and local effects, were selected for the presence of an adequate electronic patient records system. The veterinarians of the different centers participating in the study had to fill in a questionnaire with signalment (breed, age, sex, and neuter status), anamnesis, physical examination, clinicopathological data, diagnostic imaging, and specific endocrine evaluations of dogs at the time of the diagnosis of HC.

Inclusion criteria for dogs with HC

To be enrolled in the study, a dog had to present with clinical signs compatible with HC (e.g., polyuria, polydipsia, polyphagia, enlarged abdomen, and symmetrical alopecia), laboratory

findings consistent with HC (increased serum alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, and gamma-glutamyl transferase, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, hyperphosphatemia, thrombocytosis, lymphopenia, diluted urine, and proteinuria), and a positive result to at least one endocrine test between ACTH stimulation test (cortisol concentration 1 h after administration of 5 µg/kg of tetracosactide acetate IV >22 µg/dl was considered positive), low-dose dexamethasone suppression test (LDDST) or high-dose dexamethasone suppression test (HDDST). In some patients, these tests were combined with urine cortisol-to-creatinine ratio or with endogenous ACTH concentration. The medical records of the different clinics had been re-evaluated by a board-certified internist (F.F.) in order to confirm the conformance with inclusion criteria. The dogs were divided according to the list of dog breeds approved by the Italian Kennel Club (ENCI).

Control group

A control group was used to identify risk factors for HC by comparing the characteristics of dogs with HC with a population of dogs without HC. The control group included all dogs examined in the different centers of this study in the same time period mentioned above for any reason but without a diagnosis of HC. The subjects were divided according to the list of dog breeds approved by the ENCI.

Epidemiological investigation criteria

Both pre-existing cases (diagnosed with HC before data collection began) and incident cases (newly diagnosed with HC during the data collection period) were included in the prevalence estimate. This was calculated by dividing the number of HC cases by the total number of dogs attending participating clinics during the study period. The prevalence in the reference center was calculated separately. Standard methods were used to calculate the 95% confidence intervals (CIs) to indicate the precision of the estimate. To investigate the presence of a breed predisposition for HC, the prevalence was evaluated and compared with the control group only for those breeds that had at least two individuals with HC. The reported age was the one reported at the time of HC diagnosis. Similarly, to assess the gender predisposition, both dog populations (HC and control) have been divided according to their gender, with subgroups of neutered and intact.

Data analysis

Data were checked and cleaned in a spreadsheet (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corp.) and exported to Prism[®] (GraphPad software) for further analysis. The prevalence of HC was calculated either on the overall population, on the University reference center, and on the private clinics population. To evaluate the breed-related risk of developing HC, the odds ratio (OR) was calculated for each breed by choosing mixed breed dogs as the reference breed (OR = 1). ORs were also calculated to estimate the effect of gender (males versus females, with male sex as reference) and sexual status (neutered versus intact, with neutered as a reference). The statistical significance of the computed risk was evaluated through Fisher's exact test with a 95% significance level ($p < 0.05$), and CIs were also reported.

RESULTS

Demographics and prevalence

The overall dataset comprised of 21,281 dogs attending five clinics in Italy between September 2012 and September 2014. From the whole population, 104 dogs were identified with HC on the basis of history, clinical and laboratory findings, and positivity to at least one endocrine test. Table 1 reports the partition of the dataset between the various clinics. The estimated prevalence for HC in the four private clinics was 0.20% (95% CI, 0.13–0.27) and was significantly different compared to the University reference center (1.46%; 95% CI, 1.12–1.80).

Table 1. Overall dataset of dogs with HC and control group.

	University referral centre	Clinic 1	Clinic 2	Clinic 3	Clinic 4	Total
Dogs with HC	71	10	13	3	7	104
Control group	4,787	3,849	8,265	2,789	1,487	21,177
Total	4,858	3,859	8,278	2,792	1,494	21,281
Prevalence % (\pm CI)	1.46(\pm 0.34)	0.26(\pm 0.16)	0.16(\pm 0.27)	0.11(\pm 0.12)	0.46(\pm 0.35)	

CI: confidence interval.

Signalment

Age data were available for only 91 of 104 dogs with HC. Mean (\pm SD) age for dogs with HC was 9.8 (\pm 2.5) yr, and only 5 of 91 dogs (5.5%) were \leq 5 yr old. Gender data (Table 2) were available for all 104 dogs with HC and only for 19,059 of 21,177 dogs in the control group. Of 104 dogs with HC, 19.2% were intact females, 43.3% were neutered females, 29.8% were intact males, and 7.7% were neutered males. In the control group, 10,015 were male (52.5%) and 9,044 were females (47.5%). More specifically, 8,663 were intact males (45.4%), while 4,857 were intact females (25.5%), 4,187 were neutered females (22%), and 1,352 were neutered males (7.1%). Overall, considering sex regardless of neutered status, 62.5% were females and 37.5% were males. Females had higher risk for HC compared to males (OR 1.84; 95% CI, 1.24–2.75); neutered dogs had higher risk than intact dogs (OR 2.54; 95% CI, 1.72–3.73); and neutered females had a higher risk compared to intact females (OR 2.61; 95% CI, 1.54–4.42) (Table 2). No difference was noted between neutered and intact males.

Table 2. Sex status of dogs with HC compared with dogs in the control group and relative OR.

Sex status	Dogs with HC	Control group	OR (CI)	p value
Male	39	10,015	1	NA
Females	65	9,044	1.85 (1.24–2.75)	0.0025
Intact	51	13,520	1	NA
Neutered	53	5,539	2.54 (1.72–3.73)	<0.0001
Intact females	20	4,857	1	NA
Neutered females	45	4,187	2.61 (1.54–4.42)	0.0004
Intact males	31	8,663	1	NA
Neutered males	8	1,352	1.65 (0.76–3.6)	0.2

NA: not applicable; CI: confidence interval.

Of the 32 different breeds (including the mixed breed category) of dogs with HC admitted to the five clinics over the period of the study, 16 (including the mixed breed category) had at least two dogs with HC and were, therefore, included in the analysis. Using the mixed breed dogs as a control population (OR = 1), the risk of developing HC was significantly higher in the Standard Schnauzer (OR 58.1; $p < 0.0001$), Fox Terrier (OR 20.33; $p < 0.0001$), Cavalier King Charles Spaniel (OR 8.03; $p < 0.0001$), Boxer (OR 7.67; $p < 0.0001$), ShihTzu (OR 6.56; $p = 0.0033$), Bolognese (OR 6.30; $p < 0.0001$), pit bull (OR 5.98; $p = 0.0009$), Jack Russell Terrier (OR 5.65; $p = 0.0081$), Maltese (OR 4.90; $p = 0.001$), Miniature Dachshund (OR 3.52; $p = 0.0027$), Miniature Poodle (OR 3.44; $p = 0.0033$), and Yorkshire Terrier (OR 3.43; $p = 0.0018$) (Table 3).

Table 3. Breed distribution of dogs with HC compared with dogs in the control group and relative OR.

Breed	Dogs with HC	Control group	OR (CI)	<i>p</i> -value
Crossbred	33	6,709	1	NA
Standard Schnauzer	2	7	58.1 (11.63–290.10)	<0.0001
Fox Terrier	2	20	20.33(5.57–90.50)	<0.0001
Cavalier King Charles Spaniel	3	76	8.03 (2.41–26.73)	<0.0001
Boxer	4	106	7.67 (2.67–22.04)	<0.0001
Shih Tzu	2	62	6.56 (1.54–27.93)	0.0033
Bolognese	4	129	6.30 (2.20–18.05)	<0.0001
Pitbull	3	102	5.98 (1.80–19.81)	0.0009
Jack Russell Terrier	2	72	5.65 (1.33–23.98)	0.0081
Maltese	4	166	4.90 (1.72–13.99)	0.001
Miniature Dachshund	6	347	3.52 (1.46–8.45)	0.0027
Miniature Poodle	6	355	3.44 (1.43–8.25)	0.0033
Yorkshire Terrier	7	415	3.43 (1.51–7.80)	0.0018
Labrador	5	408	2.49 (0.97–6.42)	0.05
German Shepherd	2	284	1.43 (0.34–6.00)	0.62
Beagle	2	623	0.65 (0.16–2.73)	0.5

NA: not applicable; CI: confidence interval.

DISCUSSION

The current study identified an estimated prevalence of HC in the four private clinics of 0.20% (95% CI, 0.13–0.27) that was different compared to the 1.46% (95% CI, 1.12–1.80) reported for the University referral center. The reasons for this discrepancy are quite obvious because the reference center receives more cases of suspected HC. The estimated prevalence of 0.20% is similar to the 0.28% observed in a study comprising 119 primary-care veterinary practices in the United Kingdom (O'Neill *et al.*, 2016). The median age at diagnosis of HC of 9.8 (\pm 2.5) yr was in agreement with the literature information that reported HC as a disease of middle-age and older dogs with a median value of approximately 9–11 yr (Jensen *et al.*, 1997; Barker *et al.*, 2005; Gallelli *et al.*, 2010; Burkhardt *et al.*, 2013; Fracassi *et al.*, 2015a; Van Rijn *et al.*, 2015; 2016; O'Neill *et al.*, 2016). In previous studies, the female population was either overrepresented (percentages between 55% and 75%) (Reusch and Feldman, 1991; Hanson *et al.*, 2007; Gallelli *et al.*, 2010; Helm *et al.*, 2011; Burkhardt *et al.*, 2013; Arenas *et al.*, 2014; Fracassi *et al.*, 2015a; 2015b; Macfarlane *et al.*, 2016) or underrepresented (percentages between 27% and 50%) (Jensen *et al.*, 1997; Hess *et al.*, 1998; Barker *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2006; Van Rijn *et al.*, 2016). Nevertheless, the lack of a control group in all of these studies, with the exception of O'Neill *et al.* (2016), makes it hard to establish a conclusive relationship between gender and HC. In the current study, which included a control group, the results show that sex seems to be a risk factor for HC with female-to-male OR of 1.85 (95% CI, 1.24– 2.75). Furthermore, neutered dogs had a higher risk than intact dogs (OR 2.54; 95% CI, 1.72–3.73); and neutered females had a higher risk compared to intact females (OR 2.61; 95% CI, 1.54–4.42). The only other study with a control group failed to identify both sex and neutered status as risk factors (O'Neill *et al.*, 2016). In human medicine, HC has a substantial female over-represented but the cause for this predisposition remains unclear (Boscaro *et al.*, 2001; Huan *et al.*, 2014). In humans (Lacroix *et al.*, 2001; Christopoulos *et al.*, 2005), in mice (Bernichtein *et al.*, 2009), and in ferrets (Schoemaker *et al.*, 2008), there are different reports of luteinizing hormone receptor (LHR)-mediated HC. In ferrets, it is known that gonadectomy induces LHR-dependent adrenal hyperplasia and tumorigenesis, probably triggered by the elevated luteinizing hormone (LH) levels post-gonadectomy. The results of a study in dogs seem to indicate that overexpression of LHR was not responsible for HC and adrenocortical tumorigenesis but the potential functional role of LH remains to be elucidated (Galac *et al.*, 2010).

Dachshunds, Terriers, and Boxers have been identified to have a significantly higher risk of developing HC, and similar conclusions were reached by many other studies (Ling *et al.*, 1979; Jensen *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 2006; Hanson *et al.*, 2007; Helm *et al.*, 2011; Rodriguez Piñeiro *et al.*, 2011; Burkhardt *et al.*, 2013; Fracassi *et al.*, 2015a; 2015b; Van Rijn *et al.*, 2015; 2016; O'Neill *et al.*, 2016). In the present study, this finding has been confirmed and reinforced. In the present study, the Standard Schnauzer was identified as the breed with the highest OR (58.1), while the risk associated with this breed in other studies was much lower (Ling *et al.*, 1979; Hanson *et al.*, 2007; Helm *et al.*, 2011; Fracassi *et al.*, 2015a; 2015b; O'Neill *et al.*, 2016; Van Rijn *et al.*, 2016). Conversely, there are breeds which were not represented in this study but have been found to have a significant OR; for example, O'Neill *et al.* (2016) reported an elevated OR for Bichon Frisé (OR 6.5), which was not part of the examined population of this study. The reason for the differences between the results of our study and those of other previously published reports could be due to either the different distribution/representation of canine breeds in different geographic areas or to the descriptive features of other studies that did not take into account the prevalence of the different breeds. While there are overlaps, none of the studies investigate the same set of breeds. For example, our study found a high OR in the Bolognese (6.30) and pit bull (5.98), which were not described as predisposed breeds in the literature.

The main limitation of the present study is its limited spatial and temporal coverage. With only five clinics, it was not possible to cover extensively the Italian territory; and, with only two yr of temporal coverage, it was not possible to estimate the incidence of HC over time. Finally, another issue faced during this study regarded the missing data in the clinical records. In fact, there were some cases where the four private clinics did not record the age of some dogs.

Nevertheless, this is one of the first epidemiological studies on canine HC, along with O'Neill *et al.* (2016), taking into account a control population in order to generate meaningful statistics of predisposition. The results from this study are in agreement with the existing literature and give ulterior information about HC prevalence and epidemiology in the preceding uncharted Italian territory.

REFERENCES

- Ambrosi, B., Bochicchio, D., Ferrario, R., Colombo, P. and Faglia, G. 1990. Screening tests for Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol.* 33, 809–811.
- Arenas, C., Melián, C. and Pérez-alenza, M.D. 2014. Long-term survival of dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism: a comparison between mitotane and twice daily trilostane treatment. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 473–480.
- Barker, E.N., Campbell, S., Tebb, A.J., Neiger, R., Herrtage, M.E., Reid, S.W. and Ramsey, I.K. 2005. A comparison of the survival times of dogs treated with mitotane or trilostane for pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 810–815.
- Behrend, E.N. 2010. Canine hyperadrenocorticism. In: *Canine and feline endocrinology*, 4th ed. Eds., Feldman, E.C. and Nelson, R.W. St. Louis, MO: Elsevier-Saunders, pp: 377–451.
- Bell, R., Neiger, R., McGrotty, Y. and Ramsey, I.K. 2006. Study of the effects of once daily doses of trilostane on cortisol concentrations and responsiveness to adrenocorticotrophic hormone in hyperadrenocorticoid dogs. *Vet. Rec.* 159, 277–281.
- Bernichtein, S., Peltoketo, H. and Huhtaniemi, I. 2009. Adrenal hyperplasia and tumours in mice in connection with aberrant pituitary-gonadal function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300, 164–168.
- Boscaro, M., Barzon, L., Fallo, F. and Sonino, N. 2001. Cushing's syndrome. *Lancet.* 357, 783–791.
- Burkhardt, W.A., Boretti, F.S., Reusch, C.E. and Sieber-ruckstuhl, N.S. 2013. Evaluation of baseline cortisol, endogenous ACTH, and cortisol/ACTH ratio to monitor trilostane treatment in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 919–923.
- Castillo, V.A., Pessina, P.P., Garcia, J.D., Hall, P., Gallelli, M.F., Miceli, D.D. and Cabrera Blatter, M.F. 2014. Ectopic ACTH syndrome in a dog with a mesenteric neuroendocrine tumour: a case report. *Vet. Med. Czech.* 59, 352–358.
- Christopoulos, S., Bordeau, I. and Lacroix, A. 2005. Clinical and subclinical ACTH- independent macronodular hyperplasia and aberrant hormone receptors. *Horm. Res.* 64, 119–131.
- Fracassi, F., Corradini, S., Floriano, D., Boari, A., Aste, G., Pietra, M., Bergamini, P.F. and Dondi, F. 2015a. Prognostic factors for survival in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism treated with trilostane. *Vet. Rec.* 176, 49–55.
- Fracassi, F., Malerba, E., Furlanello, T. and Caldin, M. 2015b. Urinary excretion of calcium and phosphate in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism: case control study in 499 dogs. *Vet. Rec.* 177, 625–629.
- Galac, S., Kars, V.J., Klarenbeek, S., Teerds, K.J., Mol, J.A. and Kooistra, H.S. 2010. Expression of receptors for luteinizing hormone, gastric- inhibitory polypeptide, and vasopressin in normal adrenal glands and cortisol-secreting adrenocortical tumors in dogs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 39, 63–75.
- Galac, S., Kars, V.J., Voorhout, G., Mol, J.A. and Kooistra, H.S. 2008. ACTH-independent hyperadrenocorticism due to food-dependent hypercortisolemia in a dog: a case report. *Vet. J.*

177, 141–143.

- Galac, S., Kooistra, H.S., Voorhout, G., Van Den Ingh, T.S., Mol, J.A., Van Den Berg, G. and Meij, B.P. 2005. Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28, 338–348.
- Gallelli, M.F., Cabrera Blatter, M.F. and Castillo, V. 2010. A comparative study by age and gender of the pituitary adenoma and ACTH and α -MSH secretion in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Res. Vet. Sci.* 88, 33–40.
- Hanson, J.M., Teske, E., Voorhout, G., Galac, S., Kooistra, H.S. and Meij, B.P. 2007. Prognostic factors for outcome after transsphenoidal hypophysectomy in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Neurosurg.* 107, 830–840.
- Helm, J.R., Mclachlan, G., Boden, L.A., Frowde, P.E., Collings, A.J., Tebb, A.J., Elwood, C.M., Herrtage, M.E., Parkin, T.D. and Ramsey, I.K. 2011. A comparison of factors that influence survival in dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism treated with mitotane or trilostane. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 251–260.
- Hess, R.S., Kass, P.H. and Ward, C.R. 1998. Association between hyperadrenocorticism and development of calcium-containing uroliths in dogs with urolithiasis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 1889–1891.
- Huan, C., Qu, Y. and Ren, Z. 2014. Gender differences in presentation and outcome of patients with Cushing's disease in Han Chinese. *Biomed. Mater. Eng.* 24, 3439–3446.
- Jensen, A.L., Iversen, L., Koch, J., Høier, R. and Petersen, T.K. 1997. Evaluation of the urinary cortisol: creatinine ratio in the diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 38, 99–102.
- Lacroix, A., N'Diaye, N., Tremblay, J. and Hamet, P. 2001. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endoc. Rev.* 22, 75–110.
- Lindholm, J., Juul, S., Jørgensen, J.O., Astrup, J., Bjerre, P., Feldt-Rasmussen, U., Hagen, C., Jørgensen, J., Kosteljanetz, M., Kristensen, L., Laurberg, P., Schmidt, K. and Weeke, J. 2001. Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: a population-based study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 117–123.
- Ling, G.V., Stabenfeldt, G.H., Comer, K.M., Gribble, D.H. and Schechter, R.D. 1979. Canine hyperadrenocorticism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 117 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 1211–1215.
- Lourenço, B., Hoffman, J., Creevy, K. and Promislow, D. 2015. Diagnosis of canine hyperadrenocorticism is associated with gender, age, breed, and comorbid conditions. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 1173.
- Macfarlane, L., Parkin, T. and Ramsey, I. 2016. Pre- trilostane and three-hour post-trilostane cortisol to monitor trilostane therapy in dogs. *Vet. Rec.* 179, 597–605.
- O'Neill, D.G., Scudder, C., Faire, J.M., Church, D.B., Mcgreevy, P.D., Thomson, P.C. and Brodbelt, D.C. 2016. Epidemiology of hyperadrenocorticism among 210,824 dogs attending primary-care veterinary practices in the UK from 2009 to 2014. *J. Small Anim. Pract.* 57, 365–373.
- Ortega, T.M., Feldman, E.C., Nelson, R.W., Willits, N. and Cowgil, L.D. 1996. Systemic arterial blood

pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 1724–1729.

- Reusch, C.E. and Feldman, E.C. 1991. Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 5, 3–10.
- Rodriguez Piñeiro, M.I., De Fornel-Thibaud, P., Benchekroun, G., Garnier, F., Maurey-Guenec, C., Delisle, F. and Rosenberg, D. 2011. Use of computed tomography adrenal gland measurement for differentiating ACTH dependence from ACTH independence in 64 dogs with hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 1066–1074.
- Schoemaker, N.J., Kuijten, A.M. and Galac, S. 2008. Luteinizing hormone dependent cushing's syndrome in a pet ferret (*Mustela putorius furo*). *Domest. Anim. Endocrinol.* 34, 248–283.
- Van Rijn, S.J., Galac, S., Tryfonidou, M.A., Hesselink, J.W., Penning, L.C., Kooistra, H.S. and Meij, B.P. 2016. The influence of pituitary size on outcome after transsphenoidal hypophysectomy in a large cohort of dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 989–995.
- Van Rijn, S.J., Hanson, J.M., Zierikzee, D., Kooistra, H.S., Penning, L.C., Tryfonidou, M.A. and Meij, B.P. 2015. The prognostic value of perioperative profiles of ACTH and cortisol for recurrence after transsphenoidal hypophysectomy in dogs with corticotroph adenomas. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 869–876.
- Willeberg, P. and Priester, W.A. 1982. Epidemiological aspects of clinical hyperadrenocorticism in dogs (canine Cushing's syndrome). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 18, 717–724.
- Wood, F.D., Pollard, R.E., Uerling, M.R. and Feldman, E.C. 2007. Diagnostic imaging findings and endocrine test results in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism that did or did not have neurologic abnormalities: 157 cases (1989–2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231, 1081–1085.

Capitolo 9

Comparison of different monitoring methods in dogs with hypercortisolism treated with trilostane

S. Golinelli¹, G. Carotenuto¹, V. De Marco², R.O. Leal³, C. Anibaldi¹, F. Fracassi¹

29th ECVIM-CA Congress, Milan (Italy), 19-21 September 2019

¹Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, Italy;

²Naya Especialidades, Sao Paulo, Brasil

³CIISA – Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health - Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal

BACKGROUND

The monitoring of trilostane treatment, the drug of choice for the medical therapy of canine hypercortisolism (HC), is currently based on the evaluation of the clinical signs and the results of the ACTH stimulation test. However, this method has many limits and recent data have shown a lack of correlation between ACTH stimulation test results and the clinical signs of dogs with HC, treated with trilostane. Over the last years, many different studies investigated possible alternative methods with conflicting results. A single study that compares all these methods in the same canine population is lacking.

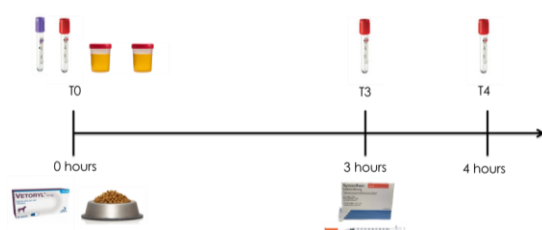
OBJECTIVES

The aim of this study was to evaluate which of the previously investigated monitoring methods better correlate with the standardized and published clinical score (CS)¹ obtained by using an owner questionnaire and could represent the best method to monitor the trilostane therapy.

120

MATERIALS AND METHODS

We conducted a prospective multicentre study. We included client owned dogs with HC on treatment with trilostane twice daily for at least two weeks, the same dog could be evaluated more than once (up to 6 evaluations); dogs should not have had a dose adjustment in the previous 10 days. We excluded dogs with concurrent illness (eg. CKD, hepatic insufficiency or diabetes mellitus), dogs in treatment with corticosteroids, dogs that did not receive trilostane the day before the test, dogs with high clinical suspicion or with a diagnosis of macroadenoma and very anxious and aggressive dogs.



T0: dogs were presented to the clinic before receiving their trilostane dose. The owner was asked to bring the first urine sample of the day of the evaluation and the first urine sample of the day before the evaluation. A blood sample was taken immediately at the time of presentation, then → trilostane dose along with the dog's normal meal provided by the owner.

T3: ACTH stimulation by taking a blood sample and then administering synthetic ACTH.

T4: a third blood sample was taken one hour after synthetic ACTH was administered.

Figure 1 – Study design

Dogs were blood sampled (Fig. 1) and categorized as: unwell (sick or over-treated dogs), well controlled (no dose increase required dogs), reasonable controlled and under controlled (dose increase required dogs) based on the CS. Unwell dogs were then excluded from further statistical analysis. Pearson and Spearman correlation coefficient were used to determine the correlation between the different monitoring methods and the total owner score in the well dogs (well controlled, reasonable controlled and under controlled dogs). The results of the CS were compared with: serum cortisol concentration pre-trilostane (T0), 3h-post-trilostane (T3) and 4h-post-trilostane (1h-post-ACTH) (T4) administration, plasma ACTH concentration pre-trilostane administration, plasma ACTH/cortisol (T0) ratio, serum haptoglobin concentration (Hp), chemistry variables (ALP, ALT, GGT), urinary cortisol/creatinine ratio and urine specific gravity (from urine of the evaluation's day and from the morning of the day before).

In the well dogs, the Kruskal-Wallis test was used to compare each of the different monitoring methods between the three categories of clinical control, as defined by the results of the owner's questionnaire. If a significant difference was found, a Mann-Whitney U test and Unpaired T-test was performed between the three different groups. If the monitoring methods results were significantly different between groups, (ROC) curves were constructed to evaluate the sensitivity and specificity of every monitoring method. Optimal cut-offs were determined so that the specificity was maximised while maintaining the sensitivity and therefore reducing the likelihood of unnecessary dose increases.

Plasma ACTH and serum and urinary cortisol were measured with a chemiluminescent assay (Immulite 2000® Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA).

RESULTS

76 re-evaluations of 37 dogs were included. Based on the questionnaire results 23 dogs showed an excellent control, 28 a reasonable control, 23 a poor control and two dogs were classified as unwell and excluded from further analysis (Fig. 2). The median score of the questionnaire was 14.

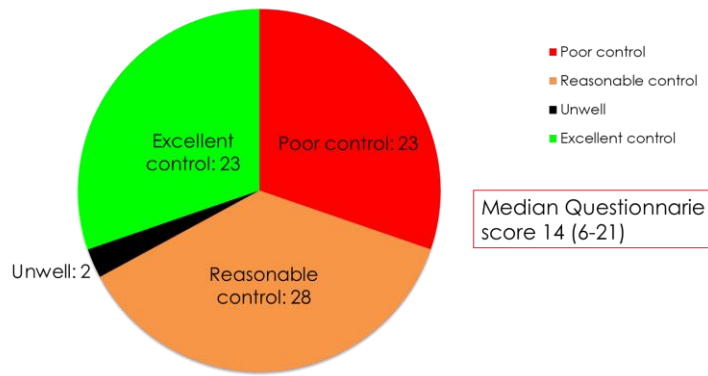


Figure 2 – Questionnaire results

Haptoglobin was the parameter that better correlated with the CS ($r=0.47$), followed by ALT ($r=0.34$), T0 ($r=0.33$) and the UCCR average of the 2 urinary samples ($r=0.33$) (Fig. 3).

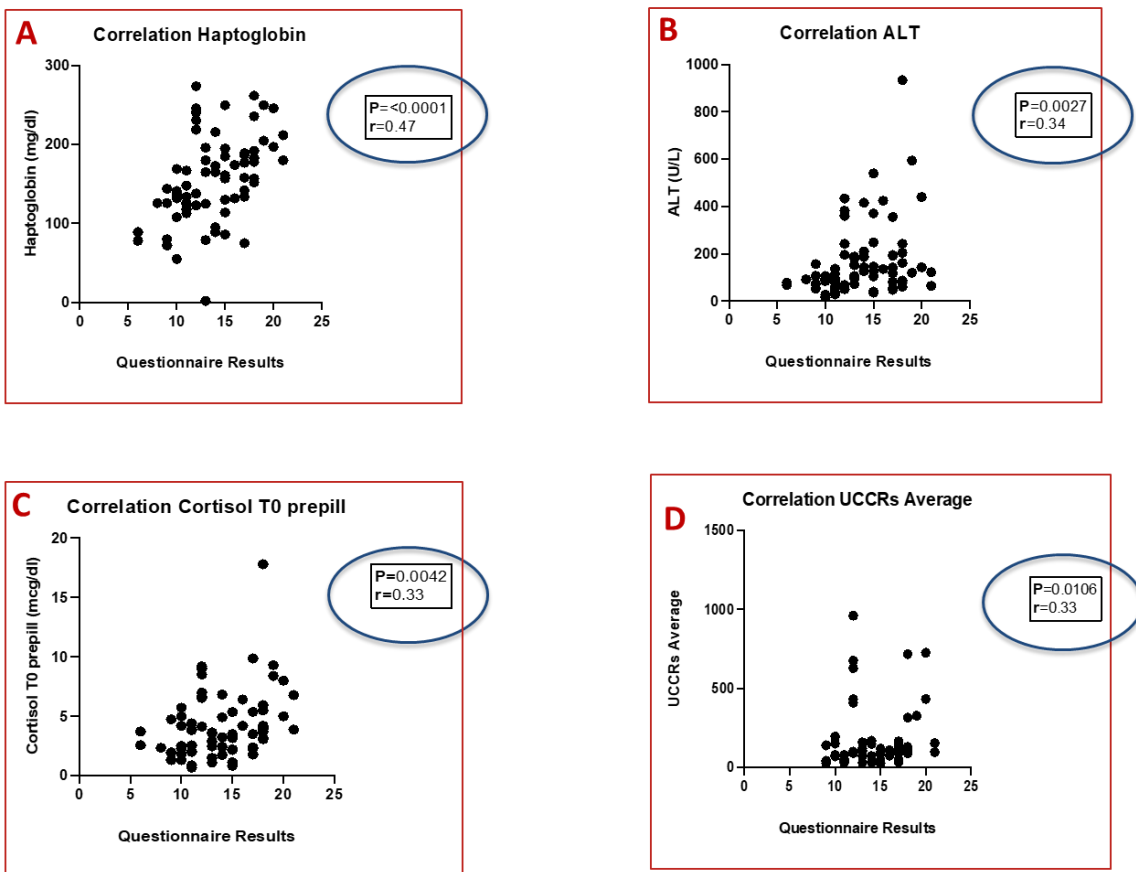


Figure 3 – Correlation of the clinical score with haptoglobin concentration (A), ALT concentration (B), prepill cortisol concentration (C) and UCCRs average (D)

The median values of all the monitoring methods were not significantly different from the reasonable and poor controlled groups and therefore those two groups were reunited as an under controlled group.

The median of haptoglobin in well controlled dogs was 126 mg/dl while in under controlled dogs was 178 mg/dl; the median of ALT was 85 U/L and 146 U/L in well controlled dogs and under controlled dogs, respectively. The medians from the two different groups were statistically different (Fig. 4, Tab. 1). The median of *prepill* in well controlled dogs was 2,34 mcg/dl while in under controlled dogs was 3.87 mcg/dl; the median of UCCR average was 51 and 114 in well controlled dogs and under controlled dogs, respectively. The medians of the two different group were statistically different (Fig. 4, Tab. 1).

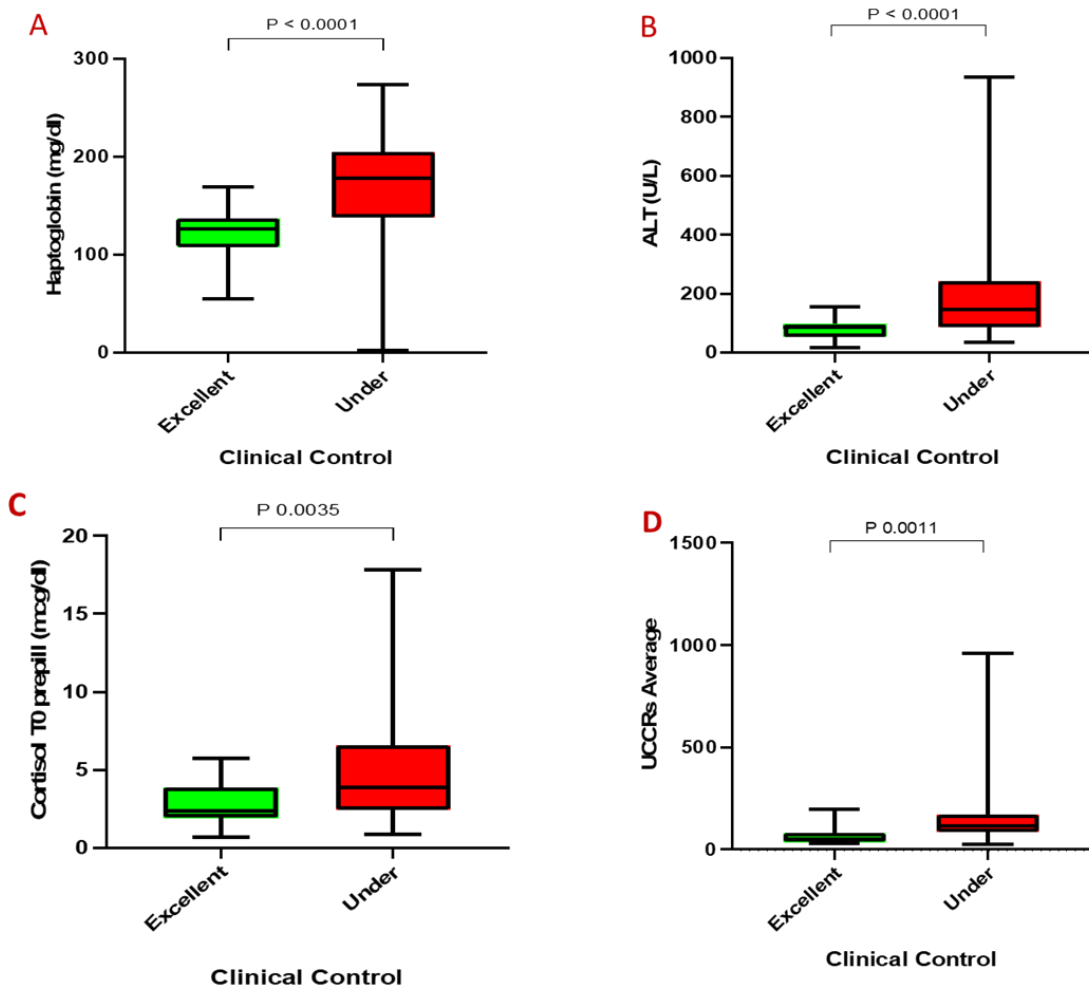


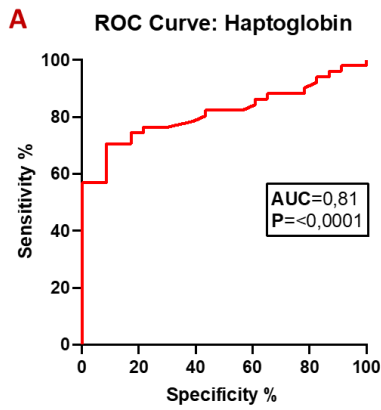
Figure 4 - Box plots of haptoglobin (A), ALT (B), prepill cortisol (C) and UCCRs average (D) divided into two groups of clinical control, an excellent and undercontrolled groups. The horizontal lines of the box represent the 25th, 50th (median) and the 75th percentiles. Outlying horizontal lines of the box represent minimum and maximum values.

Monitoring Methods	Excellent Control	Under Control
Haptoglobin (mg/dl)	126 (55-169)	178 (2-274)
ALT (U/L)	85 (16-157)	146 (66-934)
Cortisol prepill (mcg/dl)	2,34 (0,68-5,72)	3,87 (0,84-17,8)
UCCRs average	51 (28-197)	114 (26-961)

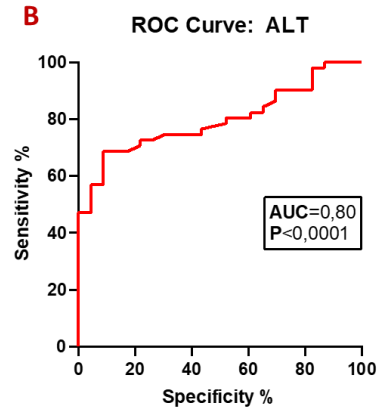
Table 1 - Median and range of haptoglobin, ALT, prepill cortisol and UCCRs average in excellent and under controlled groups

ROC curves analysis of haptoglobin and ALT to distinguish the well controlled dogs from the under controlled dogs showed an AUC (area under the curve) of 0.81 and 0.80, respectively. Taking as a cut-off 150 mg/dl for haptoglobin and 111 U/L for ALT the specificity was 91% and 87% and the sensitivity was 71% and 69%, respectively (Fig. 5).

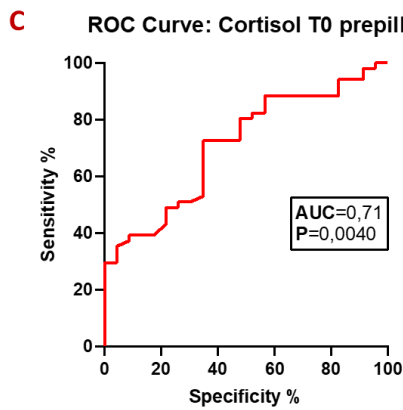
ROC curves analysis of *prepill* cortisol and UCCR average to distinguish the well controlled dogs from the under controlled dogs showed an AUC of 0.71 and 0.77. Taking as a cut off 4 mg/dl for cortisol *prepill* and 91 for UCCR the specificity was 78% and 81% and the sensitivity was 47% and 67%, respectively (Fig. 5).



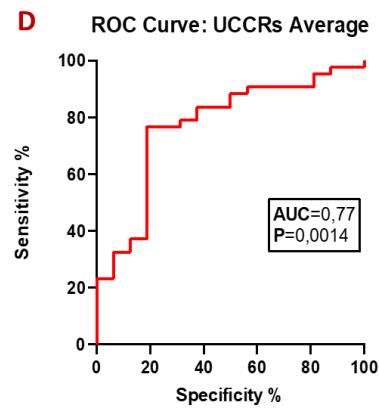
**Cut-off > 150 mg/dl Sp=91%
Se=71%**



**Cut-off > 111 U/L Sp=87%
Se=69%**



**Cut-off > 4 mcg/dl Sp=78%
Se=47%**



**Cut-off > 91 Sp=81%
Se=67%**

Figure 5 – Receiver operating characteristic (ROC) curves assessing haptoglobin (A), ALT (B), prepill cortisol concentrations (C) and UCCRs average (D) as a predictors of clinical control (excellent versus under controlled).

Using the clinical score as the reference method, the association of haptoglobin and cortisol *prepill* allows to correctly identify 85% of the dogs while 15% of the dogs resulted miss classified (Table 2).

	Excellent Control 23/74 tests (31%)	Poor Control 51/74 test (69%)
Haptoglobin > 150 mg/dl & Prepill > 4 mcg/dl	1/23 (4%)	41/51 (80%)
Haptoglobin < 150 mg/dl & Prepill < 4 mcg/dl	22/23 (96%)	10/51 (20%)

63/74 → 85% well classified

11/74 → 15% miss classified

Table 2 – Classification using the combination of haptoglobin and prepill cortisol

DISCUSSION

Hp seems to be the best parameter to monitor trilostane therapy. However, Hp has a limited capacity in identifying over-treated dogs; the concurrent evaluation of cortisol pre-trilostane may be useful in detecting an overdose of trilostane. The combined evaluation of Hp and T0 correctly categorized 85% of the cases.

According to our study ALT showed interesting results, since it is a parameter that is always present in our blood workup analysis and it could be potentially useful. The cut-off found in this study is higher in comparison with the normal upper limit range and ALT could be influenced by too many variables to be considered alone as a possible monitoring method.

The UCCR resulted significantly correlated with the clinical evaluation and was able to discriminate between the well controlled dogs and the under controlled dogs. An evaluation of the UCCR measured by liquid chromatography and mass spectrometry is necessary to better investigate this monitoring method. What we know is that chemiluminescent method measured not only cortisol but also some precursors and metabolites and it is possible that it can cause a false increase in our UCCR values.

The three hours post-trilostane cortisol and the post-ACTH cortisol did not correlate with the clinical score. This is similar with some previous studies and it confirms the limitation of this test to monitor the trilostane therapy. However, the ACTH stimulation still remains the gold standard for the diagnosis of hypoadrenocorticism and the identification of overdosed dogs.

The main limitation of this study is the small number of dogs over treated. This did not allow us to establish a lower cut-off to discriminate well controlled dogs from overdosed dogs and to correctly investigate the ability of the *prepill* cortisol to identify the overdosed patient.

Another important issue of this study was that the dogs took the pill in clinic and we cannot exclude a stress influence on gastric absorption of trilostane and on the concentration of the 3 hours post trilostane cortisol and post ACTH cortisol.

A third limitation was the subjective variability of the questionnaire that makes it impossible to consider this an objective monitoring method.

According to our study none of the monitoring methods investigated could be considered alone. However, the association of haptoglobin and *prepill* cortisol seems to be the most recommended monitoring method for trilostane treatment evaluated in this study, but the clinical evaluation still remains the gold standard.

REFERENCES

1. Macfarlane L, Parkin T and Ramsey IK. Pre-trilostane and three-hour post-trilostane cortisol to monitor trilostane therapy in dogs. *The Veterinary record* 179: 597, 2016.

Capitolo 10

Fractional excretion of electrolytes in dogs with primary hypoadrenocorticism before and after treatment

G. Carotenuto, A. Maugeri, F. Dondi, E. Malerba, C. Grisetti, F. Fracassi

29th ECVIM-CA Congress, Milan (Italy), 19-21 September 2019

BACKGROUND

Electrolytic abnormalities in dogs with primary hypoadrenocorticism (PH) have been widely described, while fractional excretion (FE) of urinary electrolytes (FEe) has not yet been evaluated. Furthermore, mineralocorticoid supplementation's monitoring is based on blood sodium ([Na]) and potassium ([K]) concentrations, and it is possible that FEe could add useful information regarding the monitoring of the treatment.

OBJECTIVES

The aim of this study was to evaluate FEe in dogs with PH. Study-population was grouped as follow:

- 1) dogs with acute adrenal insufficiency (AAI) before treatment, dogs treated for PH (TD) [both with fludrocortisone or with desoxycorticosterone pivalate (DOCP)]
- 2) dogs with PH treated with DOCP classified as well controlled ([Na] and [K] within the RI), under-controlled (hyponatremia and/or hyperkalemia) and over-controlled (hypernatremia and/or hypokalemia), respectively
- 3) dogs well controlled classified based on drug administration's timing: 9-15, 23-27 and 28-33 days after DOCP injection, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Only dogs with "typical" PH (hyponatremia and/or hyperkalemia) at the time of diagnosis were included. Healthy dogs (HD) were used as controls. Serum and urine chemistry were performed on combined samples using an automated analyser, and FEe was calculated according to the equation reported previously¹ as follows: $FEX = \frac{uX}{uCr} \div \frac{sX}{sCr}$, where uX and sX were the concentrations of a specific analyte in urine and serum, respectively. Nonparametric tests were used to compare FEe among groups. Data are expressed as median and (range). $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Seven dogs with AAI, 18 TD and 115 HD were enrolled; 76 follow-up from TD (13 DOCP, 5 fludrocortisone) dogs were evaluated.

1) FE of sodium (FENa), chloride (FECl) and calcium (FECa) were elevated in AAI [FENa% 2.64 (1.48-7.77); FECl% 3.76 (1.87-8.15); FECa% 1.68 (0.68-8.11)]; these parameters were significantly lower in TD [FENa% 0.41 (0.04-1.91); FECl% 0.72 (0.07-2.68); FECa% 0.35 (0.07-1.82)], but still significantly higher compared to HD [FENa% 0.25 (0.01-1.55); FECl% 0.54 (0.05-2.28); FECa% 0.14 (0.03-0.66)]. AAI and TD had a significantly higher FE of K (FEK%) [18.53 (8.34-62.74); 16.01 (4.33-44.19)] compared to HD [10.54 (2.23-45.20)]. Data are shown in Table I and Figure 1.

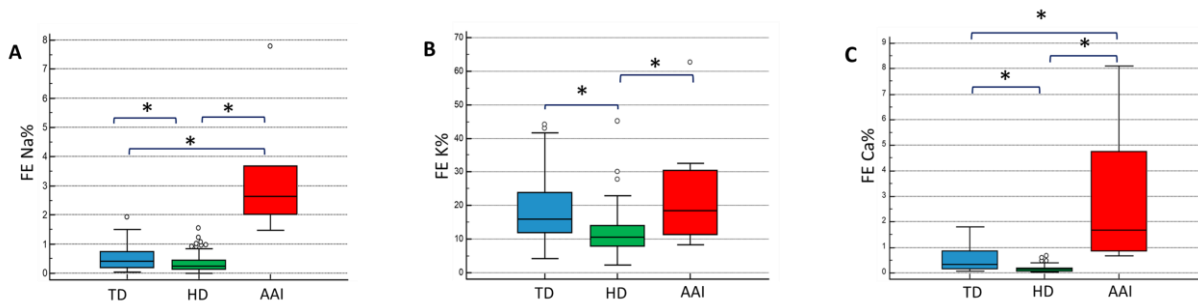


Figure 1: Box plots representing fractional excretion (FE) of urinary sodium (A), potassium (B) and calcium (C) in dogs treated for PH (TD), healthy dogs (HD) and dogs with acute adrenal insufficiency (AAI). The horizontal lines of the box represent the 25th, 50th (median) and the 75th percentiles. Outlying horizontal lines of the box represent minimum and maximum values. Open circles represent outlying data point.

Variable	TD	HD	AAI
FENa (%)	0.41 (0.04-1.91) ^a	0.25 (0.01-1.55) ^a	2.64 (1.48-7.77) ^a
FECl (%)	0.72 (0.07-2.68) ^a	0.54 (0.05-2.28) ^a	3.76 (1.87-8.15) ^a
FEK (%)	16.01(4.33-44.19) ^b	10.54 (2.23-45.20) ^{a,b}	18.53 (8.34-62.74) ^a
FECa (%)	0.35 (0.07-1.82) ^a	0.14 (0.03-0.66) ^a	1.68 (0.68-8.11) ^a

Table I: Comparison of fractional excretion (FE) of urinary electrolytes in dogs treated for PH (TD), healthy dogs (HD) and dogs with acute adrenal insufficiency (AAI). Data are reported as median and (range). ^{a,b} depict FE results that are significantly different among groups.

2) FENa and FEK were not significantly different among the 3 groups; nevertheless, despite not significant, over-controlled dogs had lower FENa and higher FEK if compared to controlled dogs [FENa% 0.40 (0.04-1.91) vs 0.43 (0.04-0.95); FEK% 17.10 (5.76-44.19) vs 16.14 (4.33-42.95)]. FECa was significantly lower in under-controlled compared to well controlled and

over-controlled dogs [FECa% 0.11 (0.07-0.14); 0.33 (0.07-1.60); 0.55 (0.17-1.82)]. Data are shown in Table II and Figure 2.

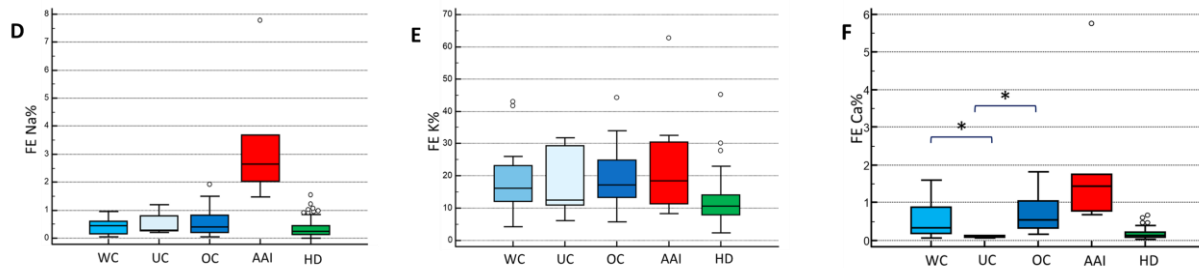


Figure 2: Box plots representing fractional excretion (FE) of urinary sodium (D), potassium (E) and calcium (F) in dogs with PH treated with DOCP classified as well controlled (WC), under-controlled (UC) and over-controlled (OC). The horizontal lines of the box represent the 25th, 50th (median) and the 75th percentiles. Outlying horizontal lines of the box represent minimum and maximum values. Open circles represent outlying data point.

Variable	DOCP Well controlled dogs	DOCP Under-controlled dogs	DOCP Over-controlled dogs
FENa (%)	0.43 (0.04-0.95)	0.29 (0.20-1.19)	0.40 (0.04-1.91)
FECl (%)	0.65 (0.07-1.57)	0.82 (0.33-0.95)	0.80 (0.16-2.68)
FEK (%)	16.14 (4.33-42.95)	12.45 (6.15-31.73)	17.10 (5.76-44.19)
FECa (%)	0.33 (0.07-1.60) ^a	0.11 (0.07-0.14) ^{a,b}	0.55 (0.17-1.82) ^b

Table II: Comparison of fractional excretion (FE) of urinary electrolytes in dogs with PH treated with DOCP classified as well controlled, under-controlled and over-controlled. Data are reported as median and (range). ^{a,b} depict FE results that are significantly different among groups.

3) FENa, FECl and FEK did not differ significantly among 3 groups; nonetheless, despite not significant, all showed an increasing trend over time. Although not significant, FECa was lower at 23-27 days after DOCP. Data are shown in Table III and Figure 3.

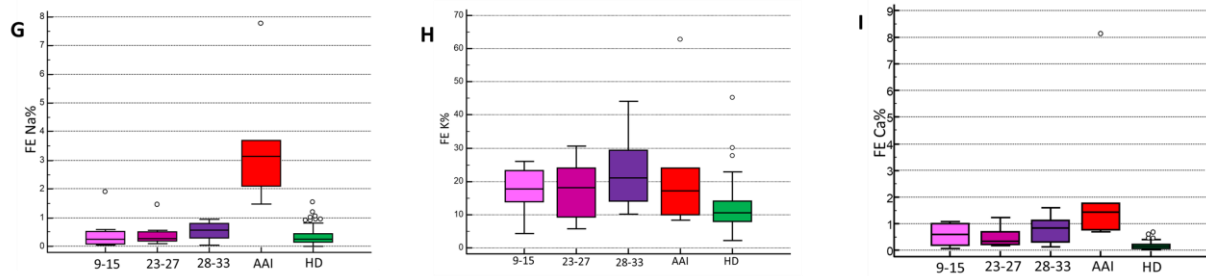


Figure 3: Box plots representing fractional excretion (FE) of urinary sodium (G), potassium (H) and calcium (I) in dogs with PH treated with DOCP classified based on drug administration's timing: 9-15, 23-27 and 28-33 days after DOCP injection. The horizontal lines of the box represent the 25th, 50th (median) and the 75th percentiles. Outlying horizontal lines of the box represent minimum and maximum values. Open circles represent outlying data point.

Variable	DOCP 9-15 days	DOCP 23-27 days	DOCP 28-33 days
FENa (%)	0.25 (0.04-1.91)	0.28 (0.11-1.45)	0.57 (0.05-0.95)
FECl (%)	0.66 (0.09-2.68)	0.73 (0.16-1.64)	0.78 (0.07-1.54)
FEK (%)	17.78 (4.33-26.09)	18.17 (5.76-30.69)	21.14 (10.11-44.19)
FECa (%)	0.60 (0.07-1.07)	0.33 (0.17-1.23)	0.82 (0.11-1.60)

Table III: Comparison of fractional excretion (FE) of urinary electrolytes in dogs with PH treated with DOCP classified based on drug administration's timing: 9-15, 23-27 and 28-33 days after DOCP injection. Data are reported as median and (range).

DISCUSSION

Dogs with AAI have high FENa, FECl, FECa and these parameters decrease after treatment. The FEK in dogs with AAI is higher compare to HD, but this value is lower compared to dogs with volume-responsive acute kidney injury². Despite not significant, OC dogs had lower FENa and higher FEK compared to CD; these findings could be attributed to DOCP overdosing. Despite not significant, the increased value of FENa and FECl at 23-27 and 28-33 days post DOCP administration are compatible with a decreased action of DOCP. In contrast, trend of FEK values, that seems to increase when the effect of DOCP is slightly decreasing, suggests other physiologic compensatory mechanism underlying the tubular handling of K. Further studies are necessary to clarify the clinical utility of the FEE in dogs treated for PH.

REFERENCES

1. Brown N, Segev G, Francey T, et al. Glomerular filtration rate, urine production and fractional clearance of electrolytes in acute kidney injury in dogs and their association with survival. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:28-34, 2015.
2. Troia R, Guarini M, Grisetti C, et al. Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: diagnostic and prognostic implications. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32:1372-1382, 2018.

Capitolo 11

Incidental adrenal masses in dogs: immunohistochemical features

G. Carotenuto, K. Sanders, F. Fracassi, S. Galac

Preliminary data about “Adrenal Incidentalomas” project conducted at the Department of Clinical Sciences of Companion Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University (November 2018-May 2019).

INTRODUCTION

Incidental adrenal masses (AIs, *adrenal incidentalomas*) in dogs are being discovered with greater frequency due to the increased use and improved quality of imaging techniques. In human, more than 70% of AIs are benign non-functioning adenoma^{1,2}; in contrast, 14 to 30% of AIs in dogs are considered to be malignant. Few studies have been carried out on AIs in dogs and the information regarding histopathological diagnosis were limited³⁻⁶. Clinical staging of AIs is usually based on the presence or absence of local invasion or distant metastases. The histological diagnosis of AIs is pivotal in order to establish the final diagnosis. An accurate diagnosis is critical because the prognosis, follow-up and therapeutic strategy for malignant tumours are different to those for benign tumours. In some cases, morphologic distinction between adrenal cortical tumours (ACTs) and medullary lesions can be difficult; moreover, diagnosing malignancy in adrenocortical and medullary neoplasms can be very challenging with standard histopathologic approaches due to the overlapping of the histological features. Different scoring systems have been developed to achieve the correct diagnosis in adrenal tumours, but interobserver variation is the weakness of all the histopathological scoring systems; therefore, diagnostic markers other than histopathological factors augmenting these scoring systems as an auxiliary diagnostic modality are needed. In humans, several immunohistochemical markers have been reported to enhance diagnostic accuracy in the differential diagnosis of resected adrenocortical neoplasm⁷. The first diagnostic pitfall in the workup of adrenal masses was linked to the misinterpretation of adrenal cortical lesion either as medullary or non-adrenal origin⁸, therefore the use of relevant biomarkers in the distinction of primary adrenal cortical origin of a non-functional neoplasm is highly recommended in human medicine⁹. In humans, Steroidogenic factor 1 (SF-1) is considered the most reliable and specific with an overall specificity of 100% and a sensitivity of 98% and 100% in adrenal cortical carcinoma (ACC) and benign adrenal cortical proliferations (adrenal cortical adenoma and hyperplasia), respectively¹⁰. In addition, SF-1 has a potential role as a prognostic marker in ACC as higher SF-1 mRNA and protein expression is associated with poor prognosis^{9,11}. In dogs with adrenal-dependent hypercortisolism, SF-1 mRNA expression was significantly greater in dogs with recurrence after adrenalectomy than in dogs without recurrence¹². In humans, another widely used biomarker is Melan-A (MART-1) which has been well-described in adrenal cortical tissue¹³. Ramos-Vara and colleagues (2001) have demonstrated the utility of Melan A in conjunction with Chromogranin A (CrA) to differentiate cortical from medullary adrenal

tumours and their metastases in dogs¹⁴. Positivity result to immunostaining for CrA and Synaptophysin (SYP) support the diagnosis of pheochromocytoma (PHEO) in dogs^{15,16}; in contrast, in human medicine, Duan and Mete (2016) demonstrated that SYP is not a reliable biomarker of adrenal medulla or neuroendocrine differentiation since it can also be expressed in adrenal cortical cells and their proliferations¹⁷. Rather, SYP expression in the setting of negative chromogranin supports cortical differentiation. Other studies observed higher expression level of SYP protein and mRNA in cortisol producing adenoma than in aldosterone producing adenoma or non-functional adenoma and SYP mRNA level showed a positive correlation with 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1) mRNA^{18,19}. CYP17A1 is a key enzyme in the steroidogenic pathway responsible for the conversion of pregnenolone to 17 α -hydroxy-pregnenolone. This protein is expressed in different steroidogenic tissues and cell types, including the zona fasciculata and reticularis of the adrenal cortex. Gene expression study on dogs with ACTH-independent hypercortisolism revealed mRNA encoding CYP17 in normal adrenal glands and in adrenocortical adenoma (ACA) and ACC without significant differences in relative mRNA levels among groups²⁰. Ki-67 proliferation index (PI) has been proposed in a large number of different kind of tumours to facilitate the distinction of malignancy. In humans, there is a general thought that most ACC often have a Ki-67 PI that exceeds 5%²¹⁻²³, moreover the Ki-67 PI has been add in the histological algorithm to predict malignancy potential of PHEO and abdominal paragangliomas²⁴⁻²⁶. Labelle and colleagues (2004) have determined a set of histologic criteria that, in combination with the immunohistochemical assessment of the Ki-67 PI, resulted helpful in the differentiation of ACA and ACC in dogs²⁷. Ki-67 PI is also a component of another histopathological scoring system recently developed to assess malignancy in cortisol-secreting adrenocortical tumours in dogs²⁸.

A combined histological and immunohistochemical approach will be needed to fully elucidate the origin and the malignant potential of these tumours.

To the best of our knowledge, no studies had evaluated immunohistochemical (IHC) features of AIs in dogs.

BACKGROUND

Incidental adrenal masses (AIs, adrenal incidentalomas) in dogs are being discovered with greater frequency due to the increased use and improved quality of imaging techniques. No studies had evaluated immunohistochemical (IHC) features of AIs in dogs.

OBJECTIVES

The aim of the study was to describe the IHC characters of AIs in dogs and to investigate their utility in supporting the histopathological diagnosis. The second aim was to assess the role of Ki-67 PI as indicator of malignancy.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples of canine AIs were collected from patients undergoing adrenalectomy between 2017 and 2019. Dogs were enrolled in the study if an adrenal mass was found in an imaging study performed for other reasons unrelated to adrenal disease. Dogs with pre-existing history of cancer, incomplete diagnostic work-up or with functioning or metastatic adrenal tumours were excluded. IHC detection of Steroidogenic factor-1 (SF-1), Melan-A (MART-1), 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1), Chromogranin A (CrA), Synaptophysin (SYP) and Ki-67 was performed on standard sections of paraffin-embedded tissue, which were cut at a 4 μ m thickness and mounted on positively charged slides. After being conventionally deparaffinized and rehydrated, sections were treated separately, according to previously reported protocols. An example of staining is shown in figure 1.

The count of Ki-67 positively stained nuclei was performed in hot spot areas, in which there seemed to be the greatest density of positive cells. A minimum of 1000 tumour cells were counted for each tumour. The Ki-67 proliferation index (PI) was defined as the number of Ki-67 positive nuclei divided by the total number of adrenocortical cells counted and was expressed as a percentage. Statistical analysis was performed using a commercially available software (GraphPad Prism 5[®], GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Normality was assessed by D'Agostino-Pearson test and data were expressed as median (range). Value of $p < 0.05$ was considered significant.

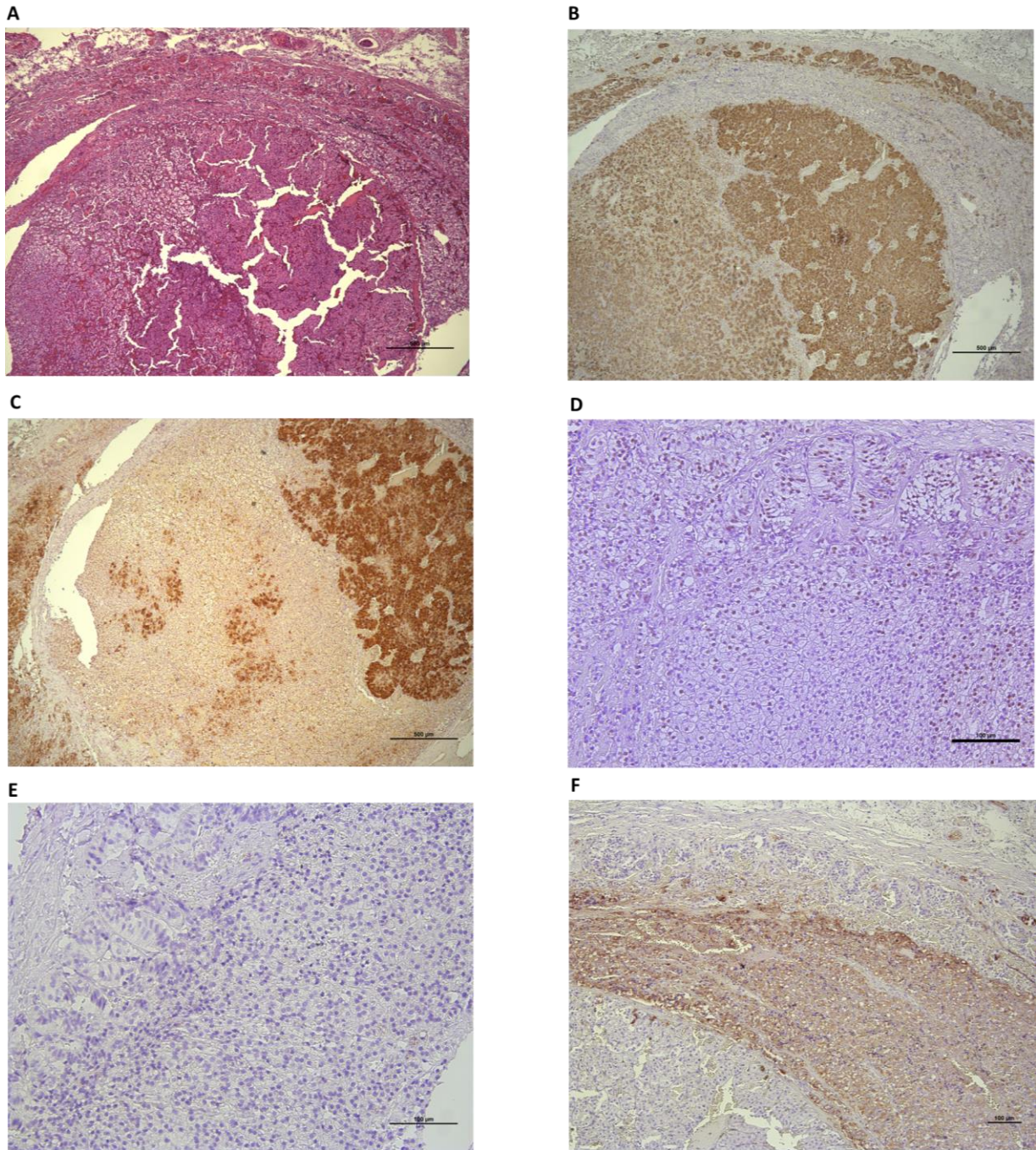


Figure 1- IHC staining for MART-1 (B), CYP17A1 (C), SF-1 (D), SYP (E) and CrA (F) of an ACT. (A) Hematoxylin and eosin (H&E).

RESULTS

Twenty dogs were enrolled in the study. Based on histopathological evaluation, 18 AIs were classified as adrenocortical tumours (ACTs) and 2 as pheochromocytoma (PHEOs). The 2 PHEOs showed a positive staining for Syn and CrA and negative staining for SF-1, MART-1 and CYP17A1. Regarding the ACTs, 2/18 (11.1%) had a positive staining for CrA and SYP and negative for SF-1, MART-1 and CYP17A1. 1/18 ACTs resulted positive only for CYP17A1. Of the other 15 (83.3%) ACTs, all were negative for CrA and SYP and positive for MART-1, 14/15 (93.3%) and 12/15 (80%) were positive for SF-1 and CYP17A1, respectively. Immunohistochemical results are shown in Table I.

Histological classification		SF-1	MART-1	CYP17A1	Syn	CrA
ACTs	2/18	-	-	-	+	+
	1/18	-	-	+	-	-
	15/18	14/15+	15/15+	12/15+	15/15 -	15/15 -
PHEOs	2/2	-	-	-	+	+

Table I – Immunohistochemical results of 20 adrenal incidentalomas

To compare the values of Ki-67 PI, AIs were classified based on immunohistochemical results that have led to the diagnosis of 15 ACTs and 5 PHEOs. The median value of Ki-67 PI (%) was 3 (0.8-37.2) in ACTs and 20 (6.7-21.4) in PHEOs, respectively. The overall median Ki-67 PI (%) value was 5.5 (0.8-37.2).

DISCUSSION

Immunohistochemical evaluation (MART-1, SF-1, CrA and SYP) in addition to histopathological evaluation, appears to be useful for the correct diagnosis of canine AIs. 75% of AIs had a Ki-67 PI value that exceeds the threshold value previously defined to differentiate adrenocortical adenoma from carcinoma. Further studies are needed to assess the utility of Ki-67 PI as indicator of malignancy in AIs in dogs.

REFERENCES

1. Terzolo M, Daffara F, Ardito A, *et al.* Management of adrenal cancer: a 2013 update. *Journal of Endocrinological Investigation* 37:207–217, 2014.
2. Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, *et al.* Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *European Journal of Endocrinology* 175:G1–G34, 2016.
3. Arenas C, Pérez-Alenza D and Melián C. Clinical features, outcome and prognostic factors in dogs diagnosed with non-cortisol-secreting adrenal tumours without adrenalectomy: 20 cases (1994-2009). *Veterinary Record* 173:501, 2013.
4. Cook AK, Spaulding KA and Edwards JF. Clinical findings in dogs with incidental adrenal gland lesions determined by ultrasonography: 151 cases (2007-2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 244:1181-1185, 2014.
5. Baum JI, Boston SE and Case JB. Prevalence of adrenal gland masses as incidental findings during abdominal computed tomography in dogs: 270 cases (2013-2014). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 249:1165-1169, 2016.
6. Nabeta R, Osada H, Ogawa M, *et al.* Clinical and pathological features and outcome of bilateral incidental adrenocortical carcinomas in a dog. *Journal of Veterinary Medical Science* 79:1489-1493, 2017.
7. Mete O, Asa SL, Giordano TJ, *et al.* Immunohistochemical biomarkers of Adrenal Cortical Neoplasm. *Endocrine Pathology* 29:137-149, 2018.
8. Duregon E, Volante M, Bollito E, *et al.* Pitfalls in the diagnosis of adrenocortical tumours: a lesson from 300 consultation cases. *Human Pathology* 46:1799-1807, 2015.
9. Lapinski JE, Chen L and Zhou M. Distinguishing clear cell renal cell carcinoma, retroperitoneal paraganglioma, and adrenal cortical lesions on limited biopsy material: utility of immunohistochemical markers. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 18:414-421, 2010.
10. Siberia S, Schull S, Assie G, *et al.* High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumours. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95:E161-E171, 2010.
11. Duregon E, Volante M, Giorelli J, *et al.* Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates. *Human Pathology* 44:822–828, 2013.
12. Galac S, Kool MMJ, van den Berg MF, *et al.* Expression of steroidogenic factor 1 in canine cortisol-secreting adrenocortical tumors and normal adrenals. *Domestic Animal Endocrinology* 49:1-5, 2014.
13. Busam KJ, Iversen K, Coplan KA, *et al.* Immunoreactivity for A103, an antibody to melan-A (Mart-1), in adrenocortical and other steroid tumors. *The American Journal of Surgical Pathology* 22:57–63, 1998.
14. Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, *et al.* Immunoreactivity of A103, an antibody to Melan A, in canine steroid-producing tissues and their tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13:328-332, 2001.

15. Cuervo L, Balaguer L, Romano J, *et al.* Immunoreactivity to chromogranin and vasoactive intestinal peptide in a canine pheochromocytoma. *Journal of Comparative Pathology* 11:327-331, 1994.
16. Doss JC, Gröne C, Capen C and Rosol TJ. Immunohistochemical localization of chromogranin A in endocrine tissues and endocrine tumors of dogs. *Veterinary Pathology* 35:312-315, 1988.
17. Duan K and Mete O. Algorithmic approach to neuroendocrine tumors in targeted biopsies: practical applications of immunohistochemical markers. *Cancer Cytopathology* 124:871–884, 2016.
18. Shigematsu K, Nishida N, Sakai H, *et al.* Synaptophysin immunoreactivity in adrenocortical adenomas: a correlation between synaptophysin and CYP17A1 expression. *European Journal of Endocrinology* 161:939-945, 2009.
19. Enberg U, Hennings J, Volpe C, *et al.* Increased ratio of mRNA expression of the genes CYP17 and CYP11B1 indicates autonomous cortisol production in adrenocortical tumours. *Journal of Endocrinological Investigation* 32:810-815, 2009.
20. Galac S, Kool MMJ, Naan EC, *et al.* Expression of the ACTH receptor, steroidogenic acute regulatory protein, and steroidogenic enzymes in canine cortisol-secreting adrenocortical tumors. *Domestic Animal Endocrinology* 39:259-267, 2010.
21. Terzolo M, Boccuzzi A, Bovio S, *et al.* Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. *Urology* 57:176–182, 2001.
22. Stojadinovic A, Brennan MF, Hoos A, *et al.* Adrenocortical adenoma and carcinoma: histopathological and molecular comparative analysis, *Modern Pathology* 16:742–751, 2003.
23. Morimoto R, Satoh F, Murakami O, *et al.* Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. *Endocrine Journal* 55:49–55, 2008.
24. de Wailly P, Oragano L, Radé F, *et al.* Malignant pheochromocytoma: new malignancy criteria. *Langenbecks Archives of Surgery* 397:239–246, 2012.
25. Bialas M, Okoń K, Dyduch G, *et al.* Neuroendocrine markers and sustentacular cell count in benign and malignant pheochromocytomas - a comparative study. *Polish Journal of Pathology* 64:129–135, 2013.
26. Kimura N, Takayanagi R, Takizawa N, *et al.* Pathological grading for predicting metastasis in pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine Related Cancer* 21:405–414, 2014.
27. Labelle P, Kyles AE, Farver TB and De Cock HE. Indicators of malignancy of canine adrenocortical tumors: histopathology and proliferation index. *Veterinary Pathology*. 41:490-497, 2004.
28. Sanders K, Cirkel K, Grinwis GCM, *et al.* The Utrecht Score: a novel histopathological scoring system to assess the prognosis of dogs with cortisol-secreting adrenocortical tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 17:329-337, 2019.

Capitolo 12

Discussioni e conclusioni

La dimetilarginina simmetrica (SDMA) è stata riconosciuta negli ultimi anni come eccellente marker di funzionalità renale sia nel cane che nel gatto; ha un'ottima correlazione con la creatinina sierica (sCr) e con il GFR e, a differenza della sCr, risulta meno influenzata da fattori extrarenali come la massa muscolare. Ad oggi non è chiaro il meccanismo con cui le patologie tiroidee influenzino i livelli sierici di SDMA; un numero limitato di studi ne ha indagato il ruolo e l'andamento in gatti ipertiroidei, diversamente questi aspetti non sono stati studiati in corso di ipotiroidismo canino. In medicina umana elevati livelli di SDMA sono stati riscontrati in pazienti ipotiroidei¹ e, in corso di ipertiroidismo, è stata osservata una correlazione positiva con le concentrazioni ematiche di free T₄ e una correlazione negativa con le concentrazioni di TSH².

Nello studio riportato al **capitolo 4** sono stati inclusi 19 gatti ipertiroidei normoazotemici ed è stato valutato l'andamento di SDMA e sCr alla diagnosi (T0) e dopo normalizzazione della funzionalità tiroidea (T1) in seguito a terapia con metimazolo; queste variabili sono state confrontate anche con un gruppo (n=18) di gatti adulti sani normoazotemici (CG, control group). La sCr e l'SDMA sono state messe in correlazione tra di loro, con il TT₄ e con il peso corporeo (BW, body weight) nei vari gruppi (gruppo di gatti ipertiroidei a T0, gruppo di gatti ipertiroidei a T1 e CG).

A T0, SDMA e TT₄ non mostravano una correlazione significativa, contrariamente a quanto osservato per sCr e TT₄ che erano debolmente e negativamente associate tra loro. Non sono stati osservati cambiamenti significativi nei valori di SDMA all'interno del gruppo di gatti ipertiroidei tra T0 e T1. Né alla diagnosi né dopo normalizzazione della funzionalità tiroidea sono state riscontrate differenze significative nelle concentrazioni di SDMA rispetto al CG; al contrario, la sCr era significativamente più alta a T1. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato in uno studio che ha valutato l'andamento di sCr, SDMA e GFR in gatti ipertiroidei prima e dopo terapia con ¹³¹I, nel quale non sono state osservate variazioni significative della SDMA dopo il trattamento a fronte di un aumento significativo della sCr e di una diminuzione del GFR³. Studi effettuati in gatti sani e in gatti con CKD hanno dimostrato una correlazione significativa tra SDMA e GFR e tra SDMA e sCr^{4,5}; una simile indagine effettuata su una popolazione di gatti ipertiroidei trattata con una dieta a forte restrizione di iodio ha dimostrato che, rispetto alla sCr, l'SDMA sembra avere una correlazione migliore con il GFR⁶. Al contrario, nel nostro studio SDMA e sCr mostravano solo una debole correlazione a

T0, parzialmente in accordo a quanto evidenziato da Buresova e coll. (2019) che hanno evidenziato una debole e non significativa correlazione tra le due variabili sia prima che dopo la terapia con ¹³¹I³. Per spiegare questo riscontro è stato ipotizzato che l'aumento del GFR in corso di ipertiroidismo influenzi la filtrazione glomerulare dell'SDMA. L'assenza di correlazione tra TT₄ e SDMA trova riscontro in altri lavori che hanno osservato una debole⁷ e assente³ correlazione tra i due parametri, contrariamente a quanto descritto nell'uomo in cui fT₄ ed SDMA sembrano essere correlate tra loro². Lo stato proteocatabolico conseguente all'ipertiroidismo e l'alterazione del metabolismo epatico delle dimetilarginine sono stati proposti come possibili meccanismi. In accordo con la letteratura, a differenza della sCr, l'SDMA non è risultata correlata con il peso corporeo^{8,9}. Nel nostro studio 5/18 gatti avevano un aumento dell'SDMA a T0, i due gatti per cui era disponibile il follow-up erano entrambi normoazotemici a T1 e l'SDMA si era normalizzata in uno dei due. Creatinina sierica ed SDMA non erano concordi anche in altri due gatti che presentavano una sCr patologica con SDMA nei range a T1. Risultati contrastanti tra le due variabili sono stati osservati anche in altri studi^{3,7}, per questo motivo è consigliabile interpretare con cautela aumenti transitori dell'SDMA nei gatti ipertiroidei e rivalutare entrambi i marker di funzionalità renale dopo il trattamento dell'ipertiroidismo.

Dai risultati di questo studio, si può supporre che lo stato di ipertiroidismo non influenzi i livelli di SDMA dal momento che questi non mostravano differenze significative prima e dopo la terapia né tra gatti ipertiroidei né tra questi ed il gruppo di controllo. È da tenere in considerazione che la natura retrospettiva dello studio, il numero esiguo di casi e il breve periodo di follow-up non permettono di trarre conclusioni definitive riguardo alle performance dell'SDMA come marker di funzionalità renale nei gatti ipertiroidei e saranno pertanto necessari ulteriori studi.

Nello studio riportato al **capitolo 7** è stato valutato l'andamento di sCr e SDMA in 24 cani ipotiroidei alla diagnosi (T0) e dopo supplementazione con levotiroxina sodica (T1); questi risultati sono stati confrontati anche con un gruppo di controllo costituito da 24 cani sani. È stata indagata inoltre l'eventuale presenza di una correlazione tra sCr, SDMA e TT₄.

Creatinina sierica e SDMA erano aumentate rispettivamente nel 33% e nel 50% dei cani ipotiroidei alla diagnosi e nella maggiore parte dei casi sono rientrate nei range di normalità

con il raggiungimento dell'eutiroidismo. L'andamento della sCr è paragonabile a quanto osservato da Gommeren e coll. (2009) in un gruppo di cani con ipotiroidismo spontaneo, un terzo dei quali presentava un aumento della sCr alla diagnosi e nei quali tale parametro era rientrato nei range di normalità in corso di terapia¹⁰; contrariamente non sono state riscontrate alterazioni dell'azotemia in cani con ipotiroidismo indotto sperimentalmente¹¹. Il tempo intercorso dallo sviluppo dell'ipotiroidismo alla sua diagnosi e i differenti range di riferimento adottati per la quantificazione della sCr nei diversi studi potrebbero avere influenzato i risultati; inoltre, l'esistenza di una relazione curvilinea tra GFR e sCr e la ridotta produzione di urea nei cani ipotiroidei potrebbero, in parte, giustificare la bassa percentuale di cani iperazotemici alla diagnosi. Nell'uomo si assiste a una rapida normalizzazione dell'azotemia in seguito alla supplementazione con ormoni tiroidei; nel nostro studio la sCr era significativamente diminuita a T1 rispetto a T0 suggerendo un miglioramento della funzionalità renale in seguito alla terapia.

La concentrazione sierica di SDMA era al di sopra dell'intervallo di riferimento in 12/24 (50%) cani alla diagnosi e in 10/12 (83,3%) si era normalizzata a T1; i due cani con SDMA aumentata sia a T0 che a T1, avevano una sCr nei *range* di riferimento a T1 e in uno dei due era aumentata a T0. Diminuzioni persistenti del GFR in corso di terapia sono state descritte sia nell'uomo che nel cane ed è possibile che l'SDMA rifletta in maniera più fedele questa condizione rispetto alla sCr. Una variabile da tenere in considerazione riguarda le performance diagnostiche dell'SDMA: nello studio di Pelander e coll. (2019) l'SDMA era superiore a 14 µg/dL in 8 cani con valori fisiologici di GFR misurato¹², pertanto non si può escludere che incrementi lievi e transitori dell'SDMA siano, in realtà, dei falsi positivi. Il metabolismo basale è influenzato dallo stato tiroideo ed essendo l'SDMA un bioprodotto del metabolismo cellulare non possiamo escludere che l'ipotiroidismo influenzi la produzione della SDMA.

La correlazione tra sCr e SDMA non è risultata significativa né a T0 né a T1 in contrasto con quanto riportato in studi precedenti che dimostrano una forte correlazione tra sCr, SDMA e GFR; ciò era probabilmente legato alla numerosità del campione, infatti, analizzando insieme i due gruppi temporali, (T0+T1), SDMA e sCr hanno mostrato una debole ma significativa correlazione ($r=0,317$; $p=0,028$). L'associazione tra SDMA e TT_4 è risultata significativa solo a T1.

In conclusione, il 50% dei cani ipotiroidei aveva elevati valori di SDMA alla diagnosi, che nella maggiore parte dei casi si sono normalizzati dopo trattamento con levotiroxina. La creatinina sierica sembra essere un marker meno sensibile nel rilevare una diminuzione del GFR in corso di ipotiroidismo essendo aumentata solo in un terzo dei cani al momento della diagnosi.

L'ipotiroidismo è una delle malattie più sovra-diagnosticate nel cane; la presentazione clinica spesso aspecifica e l'impossibilità di discriminare attraverso la valutazione del profilo tiroideo di base (T_4 e TSH) i soggetti ipotiroidei ma con TSH normale dai soggetti con NTIS fa incorrere facilmente in errori diagnostici. Attualmente, il test di stimolazione con rhTSH e la scintigrafia tiroidea sono le uniche indagini in grado di discriminare i due scenari; l'elevato costo e l'esiguo numero di strutture specializzate in grado di offrire questi servizi, rendono necessaria la ricerca di un metodo alternativo.

Per questo motivo, nello studio riportato al **capitolo 5** sono state indagate le performance diagnostiche di free T_3 , free T_4 , 3,3',5'-triiodotironina (rT_3), 3,3-diiodotironina ($3,3-T_2$) e 3,5-diiodotironina ($3,5-T_2$), misurati tramite LC-MS/MS, nel differenziare tra cani ipotiroidei (DWH, *dogs with hypothyroidism*; n=13), cani con patologie non-tiroidee (DNTI, *dogs with non-thyroidal illness*; n=12), cani con sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SD, *dogs with systemic inflammatory response*; n=12) e cani sani (HD, *healthy dogs*; n=12). La determinazione delle concentrazioni sieriche di TT_4 e cTSH sono state effettuate mediante tecnica immunoenzimatica di chemiluminescenza.

Le concentrazioni sieriche mediane di TT_4 e fT_4 erano significativamente più alte ($p < 0,001$) nei HD rispetto ai DWH, DNTI e SD. TT_4 e fT_4 erano al di sotto del *range* di riferimento (RI, *reference interval*) in tutti i cani dei gruppi DWH, DNTI e SD, ad eccezione di un cane appartenente al gruppo SD nel quale la concentrazione del TT_4 era appena al di sopra del limite inferiore del RI. Alla luce di questi risultati, la misurazione del fT_4 tramite LC-MS/MS, rispetto alla misurazione del TT_4 tramite chemiluminescenza, sembrerebbe non offrire dei vantaggi nel differenziare i DWH da cani con patologie non tiroidee, indipendentemente dalla gravità del quadro clinico.

La concentrazione sierica mediana del fT_3 era significativamente più bassa nei gruppi DWH e DNTI rispetto ai gruppi SD (rispettivamente $p < 0,001$ e $p = 0,0091$) e HD (rispettivamente

$p < 0,001$ e $p = 0,0024$). Nell'uomo, il fT_3 sembrerebbe essere meno influenzato rispetto al TT_3 dalla presenza di gravi patologie sistemiche, come dimostrato da Ray e coll. (2002) in uno studio che ha coinvolto un gruppo di pazienti ricoverati in terapia intensiva, di cui un 70% aveva basse concentrazioni di TT_3 , mentre solo il 27% presentava una diminuzione della concentrazione sierica di fT_3 ¹³. Sulla base di uno studio di Giunti e coll. (2017), ciò sembrerebbe essere vero anche nella specie canina¹⁴. Tale ricerca, condotta su un gruppo di cani con SIRS, ha dimostrato che il fT_3 , misurato in LC-MS/MS, è meno influenzato da NTI rispetto al TT_3 determinato con saggio radioimmunologico¹⁴. Nel nostro studio il fT_3 sembrerebbe un marker migliore rispetto a TT_4 e fT_4 nell'identificare cani con gravi patologie sistemiche, essendo significativamente più alto nel gruppo SD rispetto ai gruppi DWH e DNTI, ma il suo contributo non risulterebbe comunque determinante nella distinzione tra ipotiroidismo e NTI.

La concentrazione mediana del rT_3 era significativamente più bassa nel gruppo DWH rispetto ai gruppi SD ($p = 0,0141$) e HD ($p = 0,0128$). In medicina umana è comune il riscontro di elevate concentrazioni di rT_3 in corso di gravi condizioni patologiche^{15,16}. Un aumento del rT_3 è stato osservato in cani sani sottoposti ad anestesia generale e intervento chirurgico¹⁷ e a seguito della somministrazione di endotossine¹¹; diversamente, Giunti e coll. (2017) non hanno riscontrato alterazioni significative del rT_3 in un gruppo di cani con SIRS rispetto a un gruppo di cani sani¹⁴. Nel nostro studio è stata riscontrata una differenza significativa nella concentrazione sierica di rT_3 tra i gruppi DWH e SD, ma non tra i gruppi DWH e DNTI, rispecchiando lo stesso limite del fT_3 nel differenziare i soggetti ipotiroidei da quelli con *non thyroidal illness syndrome*.

La concentrazione mediana del $3,3-T_2$ era significativamente più alta nel gruppo DWH rispetto ai gruppi DNTI ($p = 0,0038$) e HD ($p = 0,0447$). Nell'uomo, la concentrazione del $3,3-T_2$ misurato con saggi radioimmunologici si comporta in maniera analoga al T_4 e al T_3 , ossia diminuisce in corso di ipotiroidismo, si normalizza durante la supplementazione ormonale e aumenta nei pazienti ipertiroidei¹⁸⁻²⁴. In medicina umana è stato documentato che numerose condizioni patologiche possono influenzare le concentrazioni di $3,3-T_2$, ma in maniera differente a seconda del tipo di patologia: diminuiscono in pazienti con infarto miocardico, neoplasie, uremia, danno cerebrale, inedia e anoressia nervosa^{19,22,24-26}, rimangono invariate in pazienti settici e aumentano in pazienti con tumori cerebrali e patologie epatiche²⁴. Nello studio di

Jonklass e coll. (2014) è stato riscontrato un aumento del 3,3-T₂ in pazienti con neoplasie tiroidee, ipotiroidismo neo-diagnosticato e pazienti ipotiroidei in terapia con levotiroxina²⁶. Nel nostro studio, il 3,3-T₂ era al di sopra del range di riferimento nel 77% dei soggetti del gruppo DWH, nel 25% dei soggetti del gruppo DNTI, nel 92% dei cani del gruppo SD e nel 67% dei cani del gruppo HD.

Non sono state riscontrate differenze significative tra i diversi gruppi per quanto concerne le concentrazioni mediane di 3,5-T₂. In medicina umana questo ormone sembra aumentare in corso di gravi malattie sistemiche²⁷ e diminuire in corso di ipotiroidismo²⁸; tuttavia, studi più datati hanno ottenuto risultati differenti²³ cosicché il suo esatto ruolo nei gravi stati patologici non è ancora stato definito.

L'analisi delle ROC curve è stata effettuata al fine di identificare valori di cut-off in grado di differenziare DWH da DNTI+SD. È stata ottenuta una AUC di 0,86 (p=0,003), 0,76 (p=0,009) e 0,75 (p=0,012) rispettivamente per fT₃, fT₄ e TT₄. Nello specifico, concentrazioni di fT₃ <0,61pmol/L sono in grado di discriminare meglio i DWH con una sensibilità del 69% (95%CI: 39-91%), una specificità dell'83% (95%CI: 63-95%) e un'accuratezza di 0,86 (95%CI: 0.74-0.98); tuttavia, anche tale parametro ha delle performance diagnostiche modeste nel discriminare tra cani ipotiroidei e cani con *non thyroidal illness syndrome*.

Le concentrazioni sieriche di fT₃ e fT₄ (LC-MS/MS) hanno mostrato delle performance migliori rispetto al TT₄ (chemiluminescenza) nell'identificare i cani ipotiroidei; tuttavia, considerando il costo della metodica e le performance diagnostiche di questi ormoni, non ci sono indicazioni sufficienti per incentivarne l'utilizzo. L'uso di test dinamici (es. test di stimolazione con rhTSH) o di indagini di diagnostica avanzata (scintigrafia) rimangono i metodi migliori per discriminare cani ipotiroidei da cani con NTIS.

Uno studio sperimentale ha dimostrato come i cani affetti da ipotiroidismo insorto da tempo possano presentare una concentrazione di cTSH nella norma²⁹. Si può pertanto supporre che i soggetti ipotiroidei con cTSH normale, essendo malati da più tempo, presentino un quadro clinico e clinico-patologico più marcato rispetto ai cani ipotiroidei con elevate concentrazioni di cTSH.

Lo studio riportato nel **capitolo 6** ha avuto l'obiettivo di valutare la presenza di una possibile correlazione tra la gravità della condizione clinica dei pazienti ipotiroidei, le variabili ematochimiche e le concentrazioni sieriche di cTSH. Sono stati inclusi nello studio 68 cani ipotiroidei; tutti i soggetti presentavano una diminuita concentrazione di TT₄ e il 72% aveva una concentrazione sierica di cTSH al di sopra dell'intervallo di riferimento. La media dei punteggi dello *score* clinico era di 5,2 (\pm 2,2); il 41% (24/58) dei pazienti presentava uno *score* clinico elevato (>5) (HCS, *high clinical score*), mentre il 59% (34/58) presentava uno *score* clinico basso (≤ 5) (LCS, *low clinical score*). Non sono state riscontrate differenze significative tra il gruppo di cani ipotiroidei HCS e LCS per quanto riguarda età, peso, risultati delle variabili clinico-patologiche e concentrazioni sieriche di TT₄ e cTSH.

I risultati di questo studio permettono di affermare che i pazienti ipotiroidei con concentrazioni di cTSH all'interno dell'intervallo di riferimento non presentano sintomatologia clinica ed alterazioni clinico-patologiche più evidenti rispetto ai soggetti con cTSH sierico al di sopra dell'intervallo di riferimento. Il riscontro di segni clinici può risultare utile al fine di aumentare il sospetto di ipotiroidismo in soggetti in cui le alterazioni ematochimiche e le concentrazioni ormonali non siano particolarmente suggestive della disendocrinia.

La letteratura veterinaria offre numerose informazioni riguardo gli aspetti clinici, diagnostici e terapeutici dell'ipercortisolismo spontaneo (HC, *spontaneous hypercortisolism*) canino, mentre le conoscenze attuali sugli aspetti epidemiologici sono limitate a pochi studi, nella maggiore parte dei quali manca il confronto con una popolazione di controllo. Lo studio riportato al **capitolo 8** ha, pertanto, avuto l'obiettivo di indagare gli aspetti epidemiologici dell'HC in una popolazione canina italiana arruolata in 4 cliniche private e in un centro di referenza per l'endocrinologia veterinaria, nel periodo compreso tra Settembre 2012 e Settembre 2014. Sono stati inclusi un totale di 21281 cani, di cui 104 con HC e i restanti utilizzati come gruppo di controllo. La prevalenza stimata nelle 4 cliniche private era dello 0,20%, simile rispetto allo 0,28% riportato da un gruppo di ricerca in Inghilterra³⁰. La più alta prevalenza (1,46%) riscontrata analizzando i casi afferenti all'Università di Bologna è presumibilmente dovuta al fatto che l'Ospedale Veterinario Universitario è un centro di referenza per l'HC. In accordo con la letteratura, che identifica l'HC come una patologia del cane di media età/anziano, nel nostro studio l'età media dei cani con HC alla diagnosi era di 9,8 (\pm 2,5) anni. Il sesso è risultato essere un fattore di rischio per l'HC, con il genere femminile significativamente più rappresentato

rispetto a quello maschile (OR 1,85; 95% CI, 1,24-2,75); il rischio era maggiore anche per i cani sterilizzati/castrati rispetto ai cani interi (OR 2,54; 95% CI, 1,72-3,73) e per le femmine sterilizzate rispetto ai maschi castrati (OR 2,61; 95% CI, 1,54-4,42). Diversamente, l'unico altro studio presente in letteratura che disponeva di una popolazione di controllo, non ha identificato il sesso e lo stato sessuale come fattore predisponente alla patologia³⁰. Nell'uomo la Sindrome di Cushing è più frequente nelle femmine, ma non sono ancora state chiarite le cause alla base di questo riscontro. La popolazione di cani con HC inclusa nel nostro studio comprendeva 16 razze diverse; utilizzando i meticci come gruppo di controllo, lo Standard Schnauzer è risultata la razza con il più alto rischio per l'HC, con un OR di 58,1; questo risultato è in disaccordo con altri studi nei quali gli era stato attribuito un rischio inferiore. Al tempo stesso, all'interno della nostra popolazione non sono state evidenziate razze per le quali altri studi hanno identificato un significativo OR. La differente distribuzione/rappresentazione delle razze canine in differenti aree geografiche e la natura descrittiva di molti studi potrebbero spiegare tale discrepanza. I risultati di questo studio hanno confermato in parte i dati presenti in letteratura e hanno fornito nuove informazioni riguardo alla prevalenza e ai fattori di rischio per l'HC canino in Italia.

Un altro aspetto molto importante dell'HC che negli ultimi anni ha destato l'attenzione di diversi gruppi di ricerca, riguarda il monitoraggio dei cani in terapia con trilostano. La prerogativa affinché un metodo di monitoraggio sia considerato efficace e sicuro è che garantisca un adeguato controllo della malattia evitando l'insorgenza di ipoadrenocorticismo iatrogeno. Con lo studio riportato al **capitolo 9** abbiamo voluto esaminare, all'interno di una popolazione di cani affetti da HC e in terapia con trilostano, quali dei parametri clinico-patologici e ormonali si correlassero meglio con lo score clinico standardizzato proposto da Macfarlane e coll. (2016) ed ottenuto tramite un questionario compilato dal proprietario³¹. I parametri valutati sono stati i seguenti: 1) concentrazione di cortisolo sierico pre-trilostano (*prepill* o T0); 2) concentrazione di cortisolo sierico a 3 ore dal farmaco (T3); 3) concentrazione di cortisolo sierico post stimolazione con ACTH (T4); 4) concentrazione di aptoglobina sierica (Hp); 5) rapporto tra le varie concentrazioni di cortisolo sierico (T0, T3 e T4) e l'ACTH endogeno; 6) variabili biochimiche sieriche quali ALT, γ GT e ALP; 7) rapporto tra cortisolo urinario e creatinina urinaria (UCCR); 8) peso specifico urinario. In base allo score clinico,

utilizzato come metodica “gold standard” per il confronto dei dati, i cani sono stati classificati in 3 categorie: *malati* (con possibili malattie concomitanti o sovradosaggio di trilostano), *ben controllati* (dosaggio invariato) e *mal controllati* (necessario aumento del dosaggio).

Sono stati inclusi 37 cani per un totale di 76 controlli. L’Hp è risultata essere il parametro che meglio si correlava con lo score clinico ($r=0,47$), seguita da ALT ($r=0,34$), cortisolo T0 ($r=0,33$) e la media dell’UCCR su due campioni di urine (giorno del controllo e giorno precedente al controllo) ($r=0,33$).

L’analisi delle ROC curve ha identificato una concentrazione di aptoglobina ≤ 150 mg/dl (sensibilità 70,6%, specificità 90,9%) e una concentrazione di cortisolo T0 ≤ 4 μ g/dl (sensibilità 45,1%, specificità 81,8%) come parametri utili per discriminare i cani ben controllati dai cani mal controllati.

L’Hp è una proteina di fase acuta che aumenta in maniera moderata nei cani con ipercortisolismo spontaneo³². Precedenti studi che ne avevano indagato il ruolo come possibile marker nel monitoraggio dell’HC, avevano concluso che non fosse un buon parametro per stabilire il grado di controllo della patologia^{33,34}. Tali affermazioni erano basate sul fatto che in questi studi la concentrazione di Hp non si correlasse in modo appropriato con il cortisolo sierico post-ACTH, il cui ruolo negli ultimi anni è stato messo in discussione in diversi studi^{31,35-37}. Nel nostro studio l’Hp è risultata efficace nel distinguere tra cani ben controllati e cani mal controllati; nello specifico, valori di Hp ≥ 150 mg/dL erano fortemente indicativi di uno scarso controllo della patologia, valori inferiori a tale cut-off erano risultati rappresentativi di buon controllo nel 57% dei casi. Questi risultati sono in accordo con quanto affermato nello studio di Ramsey e coll. (2018)³⁸.

Usando lo score clinico come *gold standard*, la valutazione contemporanea di Hp e cortisolo T0 ha permesso di classificare correttamente l’85% dei cani.

I risultati ottenuti non permettono di identificare alcun parametro che possa essere utilizzato come unico metodo di monitoraggio della terapia con trilostano nei cani con HC. La combinazione di Hp e cortisolo T0, da valutare in relazione allo score clinico, risulta essere un utile strumento per indagare l’efficacia del trattamento, oltre che essere di semplice esecuzione.

Il test di stimolazione con ACTH non è stato in grado di differenziare pazienti ben controllati da pazienti mal controllati. Tuttavia, in caso si sospetti un sovradosaggio di trilostano (in base ai risultati ottenuti dallo dal questionario e dalla concentrazione di cortisolo T0), il cortisolo post-ACTH resta il parametro di riferimento in quanto in grado di riflettere la riserva surrenalica.

L'adeguatezza della supplementazione con mineralcorticoidi nell'uomo si basa sulla valutazione della pressione arteriosa, delle concentrazioni elettrolitiche ematiche e dell'attività della renina plasmatica (PRA, *plasma renin activity*). Ad oggi, nel cane ci si affida prevalentemente alla concentrazione sierica di sodio e potassio in associazione alla valutazione clinica. Studi condotti su cani con ipoadrenocorticismo primario (PH, *primary hypoadrenocorticism*) in terapia con desossicorticosterone pivalato (DOCP) hanno dimostrato come la PRA sia un marker più accurato nel definire l'adeguatezza della terapia mineralcorticoidea³⁹. A causa degli elevati costi e della difficile gestione dei campioni, la misurazione della PRA non è un'indagine che può essere eseguita di routine. Nel **capitolo 10** abbiamo voluto indagare il ruolo delle frazioni escretorie degli elettroliti urinari (FEe) per valutare se queste riflettano le concentrazioni degli elettroliti a livello ematico e se possano rappresentare un utile supporto alla diagnosi e al trattamento del PH canino. Sono stati inclusi 7 cani con insufficienza surrenalica acuta (AAI, *acute adrenal insufficiency*) prima del trattamento, 18 cani in terapia (TD, *treated dogs*) e 115 cani sani (HD, *healthy dogs*) per un totale di 132 controlli (13 cani in terapia con DOCP e 5 con fludrocortisone acetato).

Come primo obiettivo abbiamo voluto confrontare le FEe tra: cani con AAI, HD e TD. Le FEe di sodio (Na), cloro (Cl) e calcio (Ca) erano elevate nei cani con AAI, diminuivano significativamente nei TD, rimanendo comunque significativamente più elevate rispetto ai HD. Cani con AAI e TD avevano una FE di potassio (K) significativamente più alta rispetto ai HD. L'aumento della FENa e della FeCl nei soggetti con AAI sono da ricondursi al mancato riassorbimento di sodio e cloro promosso dall'aldosterone a livello dei tubuli distali renali e potrebbero rimanere più elevate nei TD rispetto ai HD per un'aumentata filtrazione glomerulare indotta dalla contestuale terapia con glucocorticoidi. Contrariamente a quanto ci si potrebbe aspettare, la FEK è risultata essere significativamente più elevata nei cani con AAI rispetto ai HD. Confrontando i nostri dati con quelli ottenuti da un precedente studio effettuato presso la nostra struttura su cani con danno renale acuto, è emerso che la FEK dei soggetti con danno renale intrinseco, è marcatamente più alta, con una mediana di 74,9 (5,3-

399,7) rispetto al valore mediano di 18,53 (8,34-62,74) dei cani con AAI⁴⁰. Ne deduciamo che la FEK nei cani con AAI sia inappropriatamente bassa come conseguenza della carenza di aldosterone. Inaspettatamente, la FECa è risultata essere significativamente maggiore nei cani con AAI rispetto ai HD. È stato dimostrato che l'iperadrenocorticismo induce un aumento della calciuresi⁴¹; pertanto, in corso di PH, ci saremmo aspettati una FECa normale/bassa. Studi condotti su cani con PH hanno fallito nell'identificare la causa dell'ipercalcemia nelle alterazioni dei principali ormoni coinvolti nel metabolismo del calcio (paratormone, vitamina D3 e peptide correlato al paratormone)^{42,43}. Una diminuita filtrazione glomerulare, un aumento del riassorbimento tubulare, un eccessivo assorbimento di calcio dall'intestino e un maggiore riassorbimento osseo sono state proposte come possibili spiegazioni sia in medicina umana che veterinaria⁴⁴⁻⁵². Ad oggi non si conosce la causa precisa alla base dell'ipercalcemia in corso di PH e si suppone che si tratti di un meccanismo multifattoriale.

Le FEE sono state valutate in cani con PH in terapia con DOCP classificati in base alla qualità del controllo in: ben controllati (Na e K nei range di riferimento), scarsamente controllati (iponatremia e/o iperkaliemia) ed eccessivamente controllati (ipernatremia e/o ipokaliemia). FENa, FECl e FEK non differivano significativamente tra i 3 gruppi, tuttavia i pazienti con eccessivo controllo avevano una natriuresi inferiore e una FEK maggiore rispetto ai ben controllati, risultato che potrebbe essere giustificato da un sovradosaggio del farmaco.

Infine, i cani in terapia con DOCP con un buon controllo della patologia sono stati classificati in base ai giorni intercorsi dalla somministrazione del DOCP al controllo: 9-15, 23-27 e 28-33 giorni. Seppure non significativo, si può notare una tendenza delle FENa e FECl ad aumentare a 28-33 giorni dalla somministrazione del farmaco, risultato che potrebbe riflettere una fisiologica riduzione dell'efficacia del DOCP. Non in linea con questa teoria, la FEK è invece risultata più alta a 28-33 giorni, anche se in maniera non significativa, facendo supporre che ci siano altri meccanismi che intervengono per mantenere la normopotassiemia.

Il riscontro incidentale di una massa surrenalica (AIs, *adrenal incidentalomas*) nel cane rappresenta un'evenienza sempre più frequente nella pratica clinica. Nell'uomo esistono delle linee guida per la gestione dei pazienti con AI in base ai risultati di test ormonali specifici e alle dimensioni e fenotipo del tumore alle indagini di diagnostica avanzata. In medicina veterinaria non è stato stabilito un algoritmo diagnostico e il *gold standard* per stabilire l'origine benigna

o maligna non-metastatica è rappresentato dall'istopatologia. I criteri istopatologici standard possono tuttavia fallire nell'identificare l'origine del tumore (corticale vs. midollare) e il grado di malignità. Nell'uomo l'immunoistochimica è fortemente raccomandata in supporto alla diagnosi istopatologica. Nel cane non sono stati condotti studi a riguardo, pertanto abbiamo voluto descrivere le caratteristiche immunoistochimiche degli AI nel cane (**capitolo 11**).

Sono stati inclusi 20 cani sottoposti a surrenalectomia per il riscontro incidentale di una massa surrenalica. La valutazione istopatologica ha classificato 18 masse come tumori adrenocorticali (ACTs, *adrenocortical tumours*) e 2 come feocromocitomi (PHEO, *pheochromocytoma*). L'indagine immunoistochimica ha confermato l'origine neuroendocrina dei due PHEO che hanno mostrato una colorazione positiva per i marker midollari [sinaptofisina (Syn) e cromogranina A (CrA)] e negativa per i marker corticali [fattore steroidogenico-1 (SF-1), melan-A (MART-1), 17 α -idrossilasi (CYP17A1)]. Due tumori classificati come ACT all'istopatologia sono risultati positivi per i marker midollari e negativi per quelli corticali e sono pertanto stati riclassificati come PHEO. Un tumore corticale è risultato positivo solo al CYP17A1; dei rimanenti 15 (83,3%), tutti erano positivi per MART-A, 14 su 15 (93,3%) per SF-1 e 12 su 15 (80%) per CYP17A1.

Nell'uomo l'immunoistochimica per MART-1, SF-1 e CrA è consigliata dalle linee guida AIOM per l'identificazione dell'origine corticale delle lesioni surrenaliche, mentre la SYN e la CrA fanno parte del profilo immunoistochimico di base per la diagnosi del PHEO. In accordo con la letteratura, nel nostro studio MART-1, SF-1, CrA e SYN sembrano essere dei marker utili per la corretta diagnosi in corso di AI; tuttavia il limitato numero di campioni neoplastici esaminato non permette di trarre conclusioni definite a riguardo⁵³⁻⁵⁷.

Il ruolo del Ki-67 è stato indagato confrontandone i valori ottenuti tra cani con ACT (n=15) e cani con PHEO (n=5) classificati sulla base dei risultati dell'immunoistochimica. Il valore mediano del Ki-67 (%) era di 3 (0,8-37,2) per i tumori ACT e 20 (6,7-21,4) per i PHEO; il valore mediano complessivo era di 5,5 (0,8-37,2).

Nell'uomo l'espressione percentuale del Ki-67 è predittore di malignità sia nei ACT che nel PHEO, nonostante non sia possibile stabilire un preciso valore numerico che possa discriminare lesioni benigne da maligne. Un Ki-67 >5% sembrerebbe essere indicativo di carcinoma⁵⁸, ma sono stati proposti anche valori di cut-off inferiori⁵⁹; un Ki-67 >7% è stato proposto come indicatore prognostico nei pazienti con carcinoma surrenalico⁶⁰. In medicina

umana, l'espressione del Ki-67 è estremamente variabile nel PHEO: dalla pressoché assenza di reattività, all'espressione in più del 50% dei nuclei neoplastici. Nella casistica più ampia studiata, nessuno dei tumori benigni presentava una percentuale di espressione del Ki-67 superiore all'1%, tutti i tumori maligni mostravano un valore percentuale almeno superiore al 10%, e frequentemente superiore al 50%, dei nuclei neoplastici⁶¹.

Quando si campiona una massa neoplastica, l'eterogeneità del tumore condiziona il risultato delle indagini istopatologiche e immunoistochimiche. É infatti logico pensare che le informazioni che si possono avere osservando, per esempio, un'area necrotica saranno molto diverse da quelle ottenute dal campionamento di una zona a cellularità elevata. Questo discorso è da tenere in considerazione anche nell'interpretazione dei risultati del Ki-67: ad oggi non è ancora chiaro se sia più appropriato calcolarlo come media dei valori ottenuti su diverse sezioni dello stesso tumore o, piuttosto, come la somma dei valori ottenuti osservando più aree ad elevata positività per il Ki-6 in un singolo preparato istologico.

In conclusione, la valutazione immunoistochimica sembra essere un utile supporto per la corretta localizzazione (corticale vs. midollare) delle masse surrenaliche nel cane. Il MART-1 è risultato essere il marker corticale più accurato, essendo risultato negativo in tutti i PHEO e positivo in tutti i ACT. Nel 75% dei AI il Ki-67 superava il valore soglia precedentemente definito per discriminare l'adenoma dal carcinoma adrenocorticale; sono tuttavia necessari ulteriori studi per valutare l'utilità del Ki-67 come marker di malignità.

Bibliografia

1. Arikan E, Karadag CH and Guldiken S. Asymmetric dimethylarginine levels in thyroid diseases. *Journal of Endocrinological Investigation* 30:186-191, 2007.
2. Ittermann T, Bahls M, Atzler D, *et al.* L-Arginine Derivatives Are Associated with the Hyperthyroid State in the General Population. *Thyroid* 26:212-8, 2016.
3. Buresova E, Stock E, Paepe D, *et al.* Assessment of symmetric dimethylarginine as a biomarker of renal function in hyperthyroid cats treated with radioiodine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33:516-522, 2019.
4. Braff J, Obare E, Yerramilli M, *et al.* Relationship between serum symmetric dimethylarginine concentration and glomerular filtration rate in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:1699-1701, 2014.
5. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, *et al.* Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:1676-1683, 2014a.
6. Vaske HH, Armbrust L, Zicker Sc, *et al.* Assessment of renal function in hyperthyroid cats managed with a controlled iodine diet. *The International Journal of Applied Research In Veterinary medicine* 14:38-48, 2016.
7. Peterson ME, Varela FV, Rishniw M, *et al.* Evaluation of serum symmetric dimethylarginine concentration as a marker for masked chronic kidney disease in cats with hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32:295-304, 2018.
8. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, *et al.* Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *The Veterinary Journal* 202:588-596, 2014b.
9. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, *et al.* Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:808-814, 2015.
10. Gommeren K, van Hoek I, Lefebvre HP, *et al.* Effect of thyroxine supplementation on glomerular filtration rate in hypothyroid dogs. *Journal of Veterinary Intern Medicine* 23:844-849, 2009.
11. Panciera DL, Lefebvre HP. Effect of experimental hypothyroidism on glomerular filtration rate and plasma creatinine concentration in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:1045-1050, 2009.
12. Pelander L, Häggström J, Larsson A, *et al.* Comparison of the diagnostic value of symmetric dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular filtration rate in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33:630-639, 2019.
13. Ray DC, Macduff A, Drummond GB, *et al.* Endocrine measurement in survivors and non-survivors from critical illness. *Intensive Care Medicine* 28:1301-1308, 2002.
14. Giunti M, Troia R, Battilani M, *et al.* Retrospective evaluation of circulating thyroid hormones in critically ill dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Science* 18:471-477, 2017.

15. Peeters RP, Wouters PJ, van Toor H, *et al.* Serum 3,3',5'-triiodothyronine (rT3) and 3,5,3'-triiodothyronine/rT3 are prognostic markers in critically ill patients and are associated with postmortem tissue deiodinase activities. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90: 4559-4565, 2005.
16. Welsh KJ, Stolze BR, Yu X, *et al.* Assessment of thyroid function in intensive care unit patients by liquid chromatography tandem mass spectrometry methods. *Clinical Biochemistry* 50:318-322, 2017.
17. Wood MA, Panciera DL, Berry SH, *et al.* Influence of Isoflurane General Anesthesia or Anesthesia and Surgery on Thyroid Function Tests in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:7-15, 2009.
18. Wu SY, Chopra IJ, Nakamura Y, *et al.* A radioimmunoassay for measurement of 3,3'-L-diiodothyronine (T2). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 43:682-385, 1976.
19. Burger A and Sakoloff C. Serum 3,3'-L-diiodothyronine, a direct radioimmunoassay in human serum: method and clinical results. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 45:384-391, 1977.
20. Burman KD, Strum D, Dimond RC, *et al.* A radioimmunoassay for 3,3'-L-diiodothyronine (3,3'T2). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 45:339-352, 1977.
21. Gavin LA, Hammond ME, Castle JN, *et al.* 3,3'-diiodothyronine production, a major pathway of peripheral iodothyronine metabolism in man. *Journal of Clinical Investigation* 61:1276-1285, 1978.
22. Faber J, Kirkegaard C, Lumholtz IB, *et al.* Measurements of serum 3',5'-diiodothyronine and 3,3'-diiodothyronine concentrations in normal subjects and in patients with thyroid and nonthyroid disease: studies of 3',5'- diiodothyronine metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 48:611-617, 1979.
23. Nishikawa M, Inada M, Naito K, *et al.* Serum Concentration of 3,3'-diiodothyronine, 3',5'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine in altered thyroid states. *Endocrinologia Japonica* 30:167-172, 1983.
24. Pinna G, Hiedra L, Meinhold H, *et al.* 3,3'-diiodothyronine concentrations in the sera of patients with nonthyroidal illnesses and brain tumors and of healthy subjects during acute stress. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83:3071-3077, 1998.
25. Jaedig S and Faber J. The effect of starvation and refeeding with oral versus intravenous glucose on serum 3,5-, 3,3'- and 3'-5'-diiodothyronine and 3'-monoiodothyronine. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)* 100:388-392, 1982.
26. Jonklaas J, Sathasivam A, Wang H, *et al.* 3,3'-diiodothyronine concentrations in hospitalized or thyroidectomized patients: results from a pilot study. *Endocrine Practice* 20: 797-807, 2014.
27. Langouche L, Lehmpul I, Perre SV, *et al.* Circulating 3-T1AM and 3,5-T2 in critically ill patients: a cross-sectional observational study. *Thyroid* 26:1674-1680, 2016.
28. Pinna G, Meinhold H, Hiedra L, *et al.* Elevated 3,5-Diiodothyronine Concentrations in the Sera of Patients with Nonthyroidal Illnesses and Brain Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:1535-42, 1997.
29. Diaz-Espiñeira MM, Mol JA, van den Ingh TS, *et al.* Functional and morphological changes in the adenohypophysis of dogs with induced primary hypothyroidism: loss of TSH hypersecretion, hypersomatotropism, hypoprolactinemia, and pituitary enlargement with transdifferentiation. *Domestic Animal Endocrinology* 35:98-11, 2008.

30. O'Neill DG, Scudder C, Faire JM, *et al.* Epidemiology of hyperadrenocorticism among 210,824 dogs attending primary-care veterinary practices in the UK from 2009 to 2014. *Journal of Small Animal Practice* 57:365-373, 2016.
31. Macfarlane L, Parkin T and Ramsey IK. Pre-trilostane and three-hour post-trilostane cortisol to monitor trilostane therapy in dogs. *The Veterinary record* 179: 597, 2016.
32. McGrotty YL, Knottenbelt CM, Ramsey IK *et al.* Haptoglobin concentrations in a canine hospital population. *Veterinary Record* 152:562-564, 2003.
33. McGrotty YL, Arteaga A, Knottenbelt CM, *et al.* Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. *Veterinary Clinical Pathology* 34:255-258, 2005.
34. Arteaga A, Dhand NK, McCann T, *et al.* Monitoring the response of canine hyperadrenocorticism to trilostane treatment by assessment of acute phase protein concentrations. *Journal of Small Animal Practice* 51: 204-209, 2010.
35. Wehner A, Gloeckner S, Sauter-Louis C, *et al.* Association between ACTH stimulation test, clinical signs, and laboratory parameters in dogs with hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:743, 2014.
36. Ramsey I, Parkin T and Cosgrove L. Assessment of a novel methods of monitoring trilostane treatment of canine hyperadrenocorticism. Abstract BSAVA congress 2015.
37. Boretti, F, Holzthuem J, Reusch CE, *et al.* Lack of association between clinical sings and laboratory parameters in dogs with hyperadrenocorticism before and during trilostane treatment. *Schweiz Arch Tierheilkd* 158:631-638, 2016.
38. Ramsey IK, Sieber-Ruckstuhl N, Woods G, *et al.* Haptoglobin and pre-trilostane cortisol as monitoring tools for the treatment of canine hyperadrenocorticism. 28th ECVIM-CA Congress, 2018.
39. Baumstark ME, Nussberger J, Boretti FS, *et al.* Use of plasma renin activity to monitor mineralocorticoid treatment in dogs with primary hypoadrenocorticism: desoxycorticosterone versus fludrocortisone. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:1471-1478, 2014.
40. Troia R, Guarin M, Grisetti, *et al.* Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: diagnostic and prognostic implications. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32:1372-1382, 2018.
41. Fracassi F, Malerba E, Furlanello T, *et al.* Urinary excretion of calcium and phosphate in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism: case control study in 499 dogs. *The veterinary record* 19:177-625, 2015.
42. Jowsey J and Simons GW. Normocalcaemia in relation to cortisone secretion. *Nature* 217:1277-1279, 1968.
43. Gow AG, Gow DJ, Bell R *et al.* Calcium metabolism in eight dogs with hypoadrenocorticism. *Journal of Small Animal Practice* 50:426-430, 2009.
44. Walser M, Robinson BH and Duckett JW. The hypercalcemia of adrenal insufficiency. *Journal of Clinical Investigation* 42:456-465, 1963.
45. Downie WW, Gunn A, Paterson CR, *et al.* Hypercalcaemic crisis as presentation of Addison's disease. *British Medical Journal* 1:145-146, 1977.

46. Rath NC and Reddi AH. Influence of adrenalectomy and dexamethasone on matrix-induced endochondral bone differentiation. *Endocrinology* 104: 1698-1704, 1979.
47. Hahn TJ, Halstead LR and Baran DT. Effects off short term glucocorticoid administration on intestinal calcium absorption and circulating vitamin D metabolite concentrations in man. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism* 52:111-115, 1981.
48. Walker DA and Davies M. Addison's disease presenting as a hypercalcemic crisis in a patient with idiopathic hypoparathyroidism. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 14:419-423, 1981.
49. Muls E, Bouillon R, Boelaert J, *et al.* Etiology of hypercalcemia in a patient with Addison's disease. *Calcified Tissue International* 34:523-526, 1982.
50. Suzuki K, Nonaka K, Ichihara K, *et al.* Hypercalcemia in glucocorticoid withdrawal. *Endocrinologia Japonica* 33:203-209, 1986.
51. Fujikawa M, Kamihira K, Sato K, *et al.* Elevated bone resorption markers in a patient with hypercalcemia associated with post-partum thyrotoxicosis and hypoadrenocorticism due to pituitary failure. *Journal of Endocrinological Investigation* 27:782-787, 2004.
52. Sakao Y, Sugiura T, Tsuji T, *et al.* Clinical manifestation of hypercalcemia caused by adrenal insufficiency in hemodialysis patients: a case-series study. *Internal Medicine* 53:1485-1490, 2014.
53. Cuervo L, Balaguer L, Romano J, *et al.* Immunoreactivity to chromogranin and vasoactive intestinal peptide in a canine pheochromocytoma. *Journal of Comparative Pathology* 11:327-331, 1994.
54. Barthez PY, Marks SL, Woo J, *et al.* Pheochromocytoma in dogs: 61 cases (1984-1995). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11:272-278, 1997.
55. Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, *et al.* Immunoreactivity of A103, an antibody to Melan A, in canine steroid-producing tissues and their tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13:328-332, 2001.
56. Sako T, Kitamura N, Kagawa Y, *et al.* Immunohistochemical evaluation of a malignant pheochromocytoma in a wolfdog. *Veterinary Pathology* 38:447-450, 2001.
57. Bommarito DA, Lattimer JC, Selting KA, *et al.* Treatment of a malignant pheochromocytoma in a dog using ¹³¹I metaiodobenzylguanidine. *Journal of the American Animal Hospital Association* 47:e188-e194, 2011.
58. McNicol AM. Lesions of the adrenal cortex. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 132:1263-1271, 2008.
59. Schmitt A, Saremaslani P, Schmid S, *et al.* IGFII and MIB1 immunohistochemistry is helpful for the differentiation of benign from malignant adrenocortical tumours. *Histopathology* 49:298-307, 2006.
60. Morimoto R, Satoh F, Murakami O, *et al.* Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. *Endocrine Journal* 55:49-55, 2008.
61. Thompson LDR. Pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score (pass) to separate benign from malignant neoplasm. A clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. *The American Journal of Surgical Pathology* 26:551-566, 2002.