

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**RESPUESTA A DESAFÍO CON ACTH Y DEXAMETASONA EN CANINOS
SANOS**

Por

**Lucía LUQUE
Marina CARUSO**



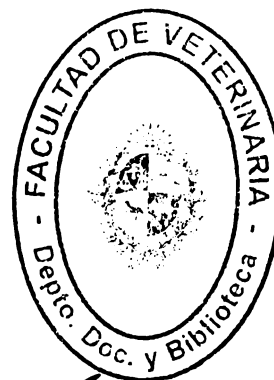
TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientaciones: **Medicina Veterinaria,
Higiene, Inspección-Control y Tecnología
de los Alimentos de origen animal**

MODALIDAD: Ensayo Experimental


**MONTEVIDEO
URUGUAY
2010**



TESIS aprobada por:




Presidente de Mesa:



Dr. Gabriel Semiglia

Segundo Miembro (Tutor):



Dra. Paula Pessina

Tercer Miembro:

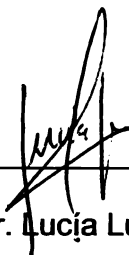


Dr. Álvaro Hernandez

Fecha:

12/05/2010

Autores:



FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con ...11(once) ~~10~~

Br. Lucía Luque

Br. Marina Caruso

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las Dras. Paula Pessina y Ana Meikle por habernos brindado la oportunidad de participar en esta investigación científica.

A la Lic. Rosina Vilaró por haber brindado su orientación profesional a la hora de documentar las referencias bibliográficas de este trabajo.

Al Dr. Víctor Castillo que generosamente ha compartido su material para la redacción del presente trabajo.

A nuestros padres que nos han dado su apoyo incondicional y confianza a lo largo de nuestra formación universitaria.

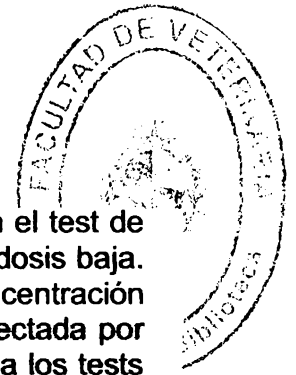
TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADRO Y FIGURAS.....	VI
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1. Anatomía de las glándulas adrenales.....	6
4.1.1. Anatomía normal de las glándulas adrenales.....	6
4.1.2. Secreción de cortisol – Síntesis.....	6
4.1.3. Fisiología.....	7
4.1.3.1. Regulación.....	7
4.1.3.2. Efectos fisiológicos de las hormonas corticoadrenales.....	8
4.1.3.3. Efecto de los glucocorticoides sobre los diferentes sistemas.....	8
4.2. Origen y Etiopatogenia del Síndrome de Cushing.....	9
4.2.1. ACTH dependientes.....	9
4.2.1.1. Enfermedad de Cushing (corticotropinomas).....	9
4.2.1.1.1. Microadenomas.....	9
4.2.1.1.2. Macroadenomas.....	9
4.2.1.2. ACTH ectópica (Carcinomas bronquiales).....	10
4.2.2. ACTH independientes.....	10
4.2.2.1. Tumores adrenales.....	10
4.2.2.1.1. Adenomas.....	10
4.2.2.1.2. Carcinomas.....	10
4.2.2.2. Hiperplasia adrenocortical nodular.....	10
4.2.2.3. Hiperplasia macronodular bilateral.....	11
4.2.2.4. Receptores ilegítimos.....	11
4.2.3. Etiopatogenia del Síndrome de Cushing.....	11
4.2.3.1. Enfermedad de Cushing (SC dependiente de la hipófisis).....	11
4.2.3.2. Tumor adrenal (TAF).....	12
4.2.3.3. Tumores hipofisarios y corticoadrenales simultáneos.....	12
4.2.3.4. Hiperplasia nodular adrenocortical.....	12
4.2.4. Signos clínicos.....	13
4.2.5. Casuística.....	13
4.3. Diagnóstico.....	14
4.3.1. Clínica.....	14
4.3.2. Análisis de laboratorio.....	14
4.3.3. Laboratorio endócrino.....	15
4.3.3.1. Ratio cortisol: creatinina en orina.....	15
4.3.3.2. Prueba de estimulación con ACTH.....	15
4.3.3.3. Prueba de supresión con Dexametasona a dosis baja.....	16
4.3.3.4. Supresión con Dexametasona a dosis alta.....	17
4.3.3.5. Prueba de ACTH endógena.....	18

4.3.4. Test de estimulación con desmopresina.....	18
4.3.5. Diagnostico por imagen.....	19
4.3.5.1. Radiografía.....	19
4.3.5.2. Ecografía abdominal.....	19
4.3.5.3. Tomografía computarizada y resonancia magnética.....	19
4.3.5.4. Diagnóstico de tumor hipofisario usando imagen por resonancia magnética aumentada en gadolinium.....	19
5. OBJETIVOS.....	20
6. MATERIALES Y METODOS.....	21
6.1. Diseño Experimental.....	21
6.2. Determinaciones hormonales.....	21
6.3. Análisis Estadístico.....	21
7. RESULTADOS.....	22
7.1. Efectos del test con ACTH y dexametasona a dosis baja.....	22
7.2. Efectos del sexo.....	22
8. DISCUSIÓN.....	25
9. CONCLUSIONES.....	27
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1: Concentración de cortisol en sangre luego del tratamiento con ACTH, dexametasona y solución salina (SLN Salina) en caninos sanos (n=7).....	22
Figura 2: Concentración de cortisol en sangre luego del tratamiento con dexametasona en machos (n=3) y hembras (n=4) sanos.....	23
Figura 3: Concentración de cortisol en sangre luego del tratamiento con ACTH en machos (n=3) y hembras (n=4) sanos.....	23
Figura 4: Concentración de cortisol en sangre luego del tratamiento con solución salina en machos (n=3) y hembras (n=4) sanos.....	24



1. RESUMEN

Para el diagnóstico concluyente del Síndrome de Cushing se utilizan el test de estimulación con ACTH o el test de supresión con dexametasona a dosis baja. Informes en otras especies diferentes del perro indican que la concentración plasmática de cortisol después de la administración de ACTH es afectada por el sexo. Investigamos el efecto del sexo en la respuesta del cortisol a los tests con ACTH y dexametasona en perros.

Utilizamos siete perros adultos sanos de la raza Cocker Spaniel (cuatro hembras y tres machos) que fueron asignados a un diseño factorial de dos en dos: cuatro perros (dos hembras y dos machos) recibieron dexametasona intravenosa a una dosis de 0.01 mg/kg, mientras que los otros tres perros recibieron una solución salina intravenosa (grupo control). Dos semanas después los tratamientos fueron invertidos. Luego de un mes, la ACTH fue administrada intravenosa (250 µg/animal) a cuatro perros (dos machos y dos hembras) mientras que el resto fue tratado con solución salina (grupo control). Las concentraciones de cortisol fueron determinadas mediante un radioinmunoanálisis directo en fase sólida.

Los perros tratados con ACTH mostraron un incremento en los niveles de cortisol desde la primera hora posterior al muestreo y hasta tres horas después de la inyección. Las concentraciones de cortisol en los perros tratados con dexametasona disminuyeron una hora post inyección y permanecieron bajas por tres horas, luego de las cuales las concentraciones de cortisol se vieron aumentadas. Los aumentos en los niveles de cortisol desde la primer hora, hasta las dos horas post inyección con ACTH fue significativamente mayor en hembras que en machos. En los machos tratados con dexametasona los niveles de cortisol descendieron desde una hora post inyección hasta tres horas después; en hembras el descenso fue más pronunciado y prolongado, hasta cinco horas post inyección.

Demostramos que la respuesta del cortisol a los tratamientos con ACTH y dexametasona en perros difiere con el sexo.

2. SUMMARY

For the conclusive diagnosis of Cushing's Syndrome, a stimulating ACTH test or a low suppressive Dexamethasone test is used. Reports in other species than the dog indicate that plasma cortisol concentration after ACTH administration is affected by gender. We investigated the effect of gender on the cortisol response to ACTH and Dexamethasone tests in dogs.

Seven healthy adult Cocker Spaniels (4 females and 3 males) were assigned to a two by two factorial design: 4 dogs (2 females and 2 males) received IV Dexamethasone 0.01 mg/kg, while the other 3 dogs received an IV saline solution (control group). Two weeks later the treatments were reversed. After one month, ACTH was given IV (250 µg/animal) to 4 dogs (2 female and 2 males) while the rest was treated with saline solution (control group). Cortisol concentrations were determined by a direct solidphase radioimmunoassay.

ACTH-treated dogs showed an increase in cortisol levels in the first hour after sampling until 3 hours post injection. Cortisol concentrations in Dexamethasone-treated dogs decreased one hour post injection and remained low for 3 hours, thereafter cortisol concentrations increased. The increase in cortisol levels from one to two hours post ACTH injection was significantly higher in females than males. In Dexamethasone-treated males cortisol levels decreased one hour post injection up to 3 hours; in females the decrease was more pronounced and prolonged, up to 5 hours post injection.

We have demonstrated that cortisol response to ACTH and Dexamethasone treatment in dogs differs according to sex.

3. INTRODUCCIÓN

Luego del descubrimiento del RIA, el avance en el conocimiento de la endocrinología animal en el mundo – si bien es posterior a la humana – ha sido vertiginoso. El desarrollo del diagnóstico de patologías endocrinas en animales de compañía y de deporte ha provocado la aparición de laboratorios de endocrinología veterinaria tanto estatales como privados en todo el mundo. Desde la década del '70 se encuentran publicaciones en las cuales se utiliza la determinación hormonal como método de diagnóstico de patologías en pequeños animales. El diagnóstico específico de las patologías endocrinas se realiza por medio de la determinación basal de algunas hormonas y/o luego de test de estímulo o supresión. Es así que un laboratorio que brinde servicios de diagnóstico en pequeños animales debe contar con las metodologías adecuadas para diagnosticar las patologías endocrinas más comunes como lo son el Síndrome de Cushing canino, hipotiroidismo canino, y diabetes mellitus canina y felina (Reusch, 2007a; Feldman y Nelson, 2007b).

El Síndrome de Cushing es una patología causada por el exceso de glucocorticoesteroides en la circulación sanguínea. Es una de las endocrinopatías más comunes en el perro, rara en gatos y responde a diversas etiologías:

- ACTH dependiente: Enfermedad de Cushing, ACTH ectópica (Carcinoma bronquial).
- ACTH independiente: Adenoma o carcinoma adrenal, hiperplasia macronodular adrenal, receptor ilegítimo.
- Iatrogénica (administración exógena de glucocorticoides a altas dosis o por periodos prolongados).

El uso masivo y abusivo de corticoides para el tratamiento de varias patologías, principalmente alergias dérmicas ha aumentado la casuística del Cushing iatrogénico. El diagnóstico de Cushing y del tipo del mismo es la pieza fundamental para el correcto tratamiento (Reusch, 2007a; Feldman y Nelson, 2007b; Castillo, V, 2009. Comunicación personal).

En el Uruguay, las patologías endócrinas en pequeños animales carecen del servicio diagnóstico específico. El Hospital de Facultad de Veterinaria y clínicas veterinarias de nuestro país no pueden confirmar los diagnósticos presuntivos de las patologías antedichas debido a la ausencia de un laboratorio referente en determinaciones hormonales en pequeños animales. En la mayoría de los casos se remiten muestras a laboratorios de análisis clínicos para humanos; pero 1) la falta de información respecto a los rangos que se consideran normales para caninos y felinos hace que el resultado de la determinación sea de escaso o nulo valor diagnóstico; 2) los propios controles de laboratorio que se utilizan en humano son más altos que los rangos encontrados en plasma canino o felino normales por lo que los métodos no tienen la sensibilidad necesaria para identificar valores anormales en animales de compañía (Pessina, P, 2008. Comunicación personal).

Para el diagnóstico del SC canino espontáneo o iatrogénico, la determinación basal de cortisol no es de ayuda, ya que ésta es muy variable, debido al ritmo

circadiano o a fases latentes y activas de tumores, y puede verse afectada por el estrés del propio muestreo (determinaciones de cortisol realizadas en donde viven los perros: 1.8 µg/dL; en las veterinarias: 3.8 µg/dL). El diagnóstico mediante el laboratorio específico endocrino, de esta patología se remite a la determinación de cortisol luego de la estimulación con ACTH, test diagnóstico que discrimina mejor el origen de la patología, o la respuesta supresora de los niveles de cortisol luego de la administración de Dexametasona (Behrend y Kempainen, 2001). Esta última es utilizada a bajas dosis para diagnosticar SC, (adrenocortical o pituitario), pero en muy pocos casos permite diferenciar el origen.

Sin embargo, el diagnóstico es mucho más amplio y estas son solamente algunas de las pruebas dinámicas que ayudan a diagnosticar. La más utilizada es el ratio cortisol/creatinina, la bioquímica sanguínea y el diagnóstico imagenológico (Resonancia Magnética y Tomografía Axial Computada) (Pessina, P, 2009. Comunicación personal).

Para determinar la respuesta en términos de secreción de cortisol a la ACTH y/o dexametasona a dosis baja, en perros normales con el objetivo de determinar normalidad, se deben tener en cuenta algunos aspectos de la secreción de cortisol. La CRH es liberada por el hipotálamo frente a una estimulación del Sistema Nervioso Central, provocando la liberación de ACTH. Existen otros factores estimulantes e inhibidores como por ejemplo la dopamina y las interleuquinas. La emisión de glucocorticoides está controlada por ACTH, hormona liberada por la hipófisis de forma pulsátil y episódica, lo que resulta en una secreción de cortisol fluctuante a lo largo del día. Por lo antedicho, es difícil establecer un verdadero ciclo circadiano, por lo que es necesario determinar las variaciones de cortisol a lo largo del día, en un laboratorio que sea referencia para nuestro país. La CRH y la ACTH se secretan en forma pulsátil con un ritmo diurno en las personas, lo cual redundo en un pico antes del despertar seguido por la declinación progresiva a lo largo del día. Los ritmos diurnos no fueron establecidos en perros (Kempainen y col., 1984; Reusch, 2007a; Feldman y Nelson, 2007b; Herrtage, 2007c).

Por otro lado, es sabido que la respuesta del cortisol al test de estimulación con ACTH en algunas especies (ovinos, ratas, humanos) depende del género (hembras vs machos) (Ferrini y col., 1990; Canny y col., 1999; van Lier y col., 2003; Binder y col., 2009). En caninos es poco lo que se conoce al respecto, un estudio realizado con ovejeros alemanes para determinar la concentración plasmática de cortisol basal mediante radioinmunoensayo, concluyó que no hay una variación significativa de la hormona vinculada al sexo (Moolchandani y col., 2004). En otro estudio donde se midió la concentración de cortisol en saliva utilizando radioinmunoanálisis en perros en entrenamiento (18 hembras y 15 machos), no se determinaron diferencias significativas en los niveles de cortisol entre machos y hembras y tampoco de acuerdo a la edad (Haubenhofner y col., 2005).

El presente ensayo tuvo como objetivo establecer los rangos de respuesta a la estimulación con ACTH y a la supresión con Dexametasona a baja dosis en perros sanos, machos y hembras a lo largo del día. Esto permitió conocer como

se comportan dichos animales frente a los test mencionados y, por lo tanto, poder tomarlos como referencia para llegar a un diagnóstico de SC de manera certera y confiable, así como también seleccionar en forma adecuada la hora de muestreo post desafío, permitiendo estandarizar los protocolos diagnóstico (los cuales serán de gran utilidad para los veterinarios clínicos).

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Anatomía de las glándulas adrenales

4.1.1. Anatomía normal de las glándulas adrenales

Las glándulas adrenales son pares y se encuentran junto al techo del abdomen, cerca de la unión toracolumbar. Se localizan craneo-medialmente al riñón y son retroperitoneales. Generalmente son asimétricas e irregulares y se moldean a los vasos vecinos que son la aorta a la izquierda, y la vena cava caudal a la derecha. Son firmes y al doblarse se fraccionan con facilidad.

En un perro mediano, dichas glándulas miden aproximadamente 2.5 x 1 x 0.5 cm (Dyce y col., 2002).

Histológicamente, se dividen en corteza y médula. La corteza está cubierta por una cápsula fibrosa y de coloración amarillenta. La médula es oscura y presenta una apariencia más uniforme. La corteza es de origen mesodérmico. La zona más externa de la misma es la glomerular (25%) y produce mineralocorticoides. Las zonas subyacentes son fascicular (60%) productora de glucocorticoides y la reticular (15%), encargada de producir ciertos esteroides sexuales. La médula es de origen ectodérmico y está compuesta por células que producen sustancias transmisoras: noradrenalina y adrenalina, y por lo tanto comparten con el sistema nervioso simpático el control de la respuesta del cuerpo a la huida (Dyce y col., 2002).

La vascularización de estas glándulas es abundante y se origina de pequeñas ramas de los troncos vecinos: las arterias aorta, renal, lumbar, mesentérica craneal y frénico-abdominal. Poseen una inervación que no se localiza fácilmente y somete a la corteza de estas glándulas al control del hipotálamo. En la médula existen fibras simpáticas principalmente (Dyce y col., 2002).

4.1.2. Secreción de cortisol – Síntesis

La biosíntesis de los esteroides adrenales se realiza a partir del colesterol (precursor) por medio de transformaciones enzimáticas. El colesterol pasa a 17-hidroxi pregnenolona (17 α -hidroxilasa), ésta pasa a 17-hidroxi progesterona (3 β -deshidrogenasa), luego a 11-deoxi cortisol (21 β -hidroxilasa), y finalmente a cortisol (11 β -hidroxilasa) (Chastain y col., 1990).

El control de la secreción de glucocorticoides se realiza mediante un feedback negativo: el exceso de cortisol controla la síntesis de ACTH y CRH, y a su vez, los niveles de ACTH controlan los niveles de CRH. La secreción de ACTH a su vez está regulada por la secreción de CRH desde el hipotálamo. El cortisol secretado por la corteza adrenal tiene un efecto de respuesta negativa sobre el hipotálamo, disminuyendo la formación de CRH; y sobre la hipófisis, disminuyendo la formación de ACTH. La emisión episódica de CRH y de ACTH se perpetúa mediante el efecto recíproco del cortisol que actúa a través del feedback negativo. Este arreglo recíproco no aguanta durante los períodos de stress cuando tanto la ACTH como el cortisol se mantienen en concentraciones elevadas, debido a que los efectos del stress tienden a provocar que el

feedback negativo normal no funcione (Chastain y col., 1990; Behrend y Kempainen, 2001; Herrtage, 2007).

El otro mecanismo inhibitorio es por la Dopamina, a través del receptor D2 corto. En la pars intermedia no hay inhibición por los corticoides, siendo la dopamina quien ejerce el efecto inhibitorio en esta zona (Castillo, V, 2009. Comunicación personal).

4.1.3. Fisiología

4.1.3.1. Regulación

Los neurotransmisores que regulan la liberación de hormonas hipofisotropas son:

- Hormona liberadora de corticotropina (CRH)
- Arginina vasopresina (AVP)

Éstas, son las principales neurohormonas liberadoras de la hormona adrenocorticotropa (ACTH).

La CRH es un polipéptido formado por 41 residuos de aminoácidos, que presenta una vida media plasmática de 60 minutos. Es secretado por neuronas localizadas en la porción anterior de los núcleos paraventriculares del hipotálamo y se traslada a través de la circulación portal hipotálamo-hipófisis, hasta las células corticotropas de la adenohipófisis, donde se estimula la liberación de ACTH (Reusch, 2007).

La arginina vasopresina y angiotensina II también estimulan la secreción de CRH, potenciando de esta manera, la secreción de ACTH. La oxitocina inhibe la secreción de ACTH mediada por CRH (Feldman y Nelson, 2007).

Las funciones reguladoras de la arginina vasopresina, oxitocina y angiotensina II sobre la secreción de ACTH no se demostraron sólidamente en el perro, pero se ha sustanciado la importancia de la CRH en el control de la liberación normal de ACTH (Feldman y Nelson, 2007).

La ACTH es un polipéptido monocatenario formado por 39 aminoácidos que se sintetiza a partir de una gran molécula precursora, la proopiomelanocortina (POMC). En las células corticotropas de la hipófisis anterior, el ARNm dirige la síntesis del POMC y su procesamiento en fragmentos bioactivos más pequeños. La ACTH estimula la síntesis y secreción de hormonas de la corteza adrenal. La síntesis y liberación de glucocorticoides está regulada casi exclusivamente por la ACTH (Feldman y Nelson, 2007).

El control neuroendocrino en caninos se ve afectado por cuatro mecanismos:

- La ACTH se secreta en forma pulsátil y episódica influida por el hipotálamo. El número de pulsos varía entre 6 y 12 horas por cada período de 24 horas. También, esta hormona aumenta en respuesta a la ingesta (Reusch, 2007a; Feldman y Nelson, 2007b; Herrtage, 2007c).
- El estrés es otro de los mecanismos que afectan el control neuroendocrino. La ACTH y el cortisol se secretan a los pocos minutos de desencadenarse el estrés, debido a que el estrés se origina en el sistema nervioso central y provoca un aumento de la secreción de AVP y CRH. A pesar de que los niveles endógenos de cortisol no amortiguan la respuesta de la ACTH al

estrés, los corticoesteroides exógenos en dosis altas la suprimen (Reusch, 2007).

- El cortisol y los glucocorticoides sintéticos ejercen una retroalimentación negativa a nivel hipotalámico e hipofisario sobre la secreción de ACTH. Existen dos mecanismos de retroalimentación: “retroalimentación rápida” y “retroalimentación lenta”. La retroalimentación rápida aparece rápidamente y cuya inhibición afecta a la secreción estimulada, pero no a la basal. La retroalimentación lenta, depende de los niveles de esteroides y produce una reducción de la síntesis de ACTH. La inhibición de la retroalimentación lenta afecta a la liberación de ACTH basal y estimulada. Esta última forma de retroalimentación es la testada por la prueba de supresión con dexametasona. Además, la ACTH ejerce un mecanismo de retroalimentación negativo sobre su propia secreción (Reusch, 2007a; Feldman y Nelson, 2007b).
- La liberación de interleucina-1, interleucina-6, factor de necrosis tumoral, y otras citocinas asociadas al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal afectan el control neuroendocrino (Reusch, 2007). La liberación de citocinas (al igual que el dolor, la lesión tisular, la hipotensión, la hipoglucemia, la hipoxemia y otras señales del organismo) son percibidas y transmitidas al sistema nervioso central e hipotálamo los cuales integran dichas señales aumentando o disminuyendo la liberación de hormona liberadora de corticotropina. Esta hormona circula a la hipófisis anterior, donde estimula la liberación de ACTH. El cortisol liberado por las adrenales, o de origen exógeno, inhibe el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Martínez Franco y col., 2004).

La estimulación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal resulta en una elevación de los niveles de cortisol y es una de las respuestas hormonales más importantes en enfermedades graves, trauma, sepsis, anestesia y cirugías mayores (Martínez Franco y col., 2004).

4.1.3.2. Efectos fisiológicos de las hormonas corticoadrenales

El efecto principal de dichas hormonas es sobre el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas:

- Aumentan la gluconeogénesis
- Disminuyen el transporte de la glucosa (baja la utilización en tejidos)
- Aumentan la glucosa en sangre (hiperinsulinemia secundaria)
- Disminuyen la síntesis proteica
- Aumentan el catabolismo proteico (desgaste muscular)
- Aumentan la lipólisis (emisión de ácidos grasos desde los tejidos y redistribución del tejido adiposo) (Chastain y col., 1990; Behrend y Kempainen, 2001; Herrtage, 2007).

4.1.3.3. Efectos de los glucocorticoides sobre los diferentes sistemas

- Hígado: aumenta la gluconeogénesis induciendo la formación de enzimas gluconeogénicas hepáticas. Uno de los efectos de una

gluconeogénesis elevada es un aumento remarcable en las reservas de glicógeno dentro de los hepatocitos;

- Músculo: aumenta el catabolismo proteico produciendo debilidad y desgaste muscular;
- Hueso: provoca osteopenia y por lo tanto un equilibrio del calcio negativo;
- Piel: aumenta el catabolismo proteico y, por lo tanto alteración de fibras de colágeno y elastina, produciendo una piel delgada e inelástica, mala curación de heridas y pobre formación de cicatrices;
- Sangre: produce eritrocitosis disminuyendo los linfocitos circulantes y los eosinófilos y aumentando los neutrófilos;
- Riñón: aumenta el índice de filtración glomerular causando interferencia con la acción o emisión de hormona antidiurética (poliuria). Además aumenta la excreción de calcio;
- Sistema inmunitario: provoca disminución de la respuesta inflamatoria e inmunitaria;
- Tejido adiposo: Aumenta la lipólisis y produce redistribución de la grasa;
- Pituitaria e hipotálamo: supresión de ACTH y CRH (Chastain y col., 1990; Behrend y Kempainen, 2001; Frank 2006; Herrtage, 2007).

4.2. Origen y Etiopatogenia del Síndrome de Cushing

4.2.1. ACTH dependientes

4.2.1.1. Enfermedad de Cushing (corticotropinomas)

4.2.1.1.1. Microadenomas

Según Feldman y Nelson (2007) el 80 a 85% de los perros con Síndrome de Cushing natural tienen Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis.

La mayoría de los tumores hipofisarios secretores de ACTH son microadenomas ya que miden menos de 1 cm. de diámetro (Feldman y Nelson, 2007). Esto se contraponen con lo encontrado por Galleli y col. (2009), quienes sugieren que en el perro son los macroadenomas (Galleli, M, 2009. Comunicación personal). Por lo general no presentan cápsula pero pueden estar rodeados de células hipofisarias normales comprimidas (Feldman y Nelson, 2007).

Al aplicarles una coloración histológica de rutina se revelan láminas compactas de células basófilas bien granuladas con una disposición sinusoidal. Los adenomas secretores de ACTH muestran una zona de hialinización perinuclear (cambios de Crooke) resultante de la exposición crónica de las células corticotropas al hipercortisolismo (Feldman y Nelson, 2007).

4.2.1.1.2. Macroadenomas

Entre el 10 y 20% de los perros que presentan Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis presentan neoplasias hipofisarias voluminosas. Un macroadenoma se define como un tumor visible al examen macroscópico de la pituitaria, o con más de 1 cm. de diámetro. Dichos tumores comprimen o

invaden estructuras adyacentes ya que se expanden más allá de la silla turca. Generalmente se expanden hacia dorsal del hipotálamo lo cual en muchos casos ocasiona signos clínicos. A la histopatología de rutina, estas neoplasias pueden parecer cromofóbicas pero suelen contener ACTH y sus péptidos relacionados.

Los tumores malignos son poco comunes aunque existentes (Feldman y Nelson, 2007).

4.2.1.2. ACTH ectópica (Carcinomas bronquiales)

Este problema todavía no se diagnosticó en el perro. En pacientes humanos comprende un grupo variable de neoplasias con capacidad para sintetizar y secretar ACTH, la cual finalmente ocasiona hiperplasia adrenocortical e hipercortisolismo. Los tumores con el potencial de provocar este síndrome en las personas incluyen carcinoma pulmonar a células pequeñas, timoma, tumores insulares pancreáticos, carcinoma medular tiroideo y tumoraciones pulmonares. Cuando tales neoplasias sintetizan y secretan cantidades excesivas de ACTH bioactiva, los péptidos relacionados (β -LPH y β -endorfina) también son sintetizados y secretados en exceso, al igual que fragmentos de ACTH inactivos (Feldman y Nelson, 2007).

4.2.2. ACTH independientes

4.2.2.1. Tumores adrenales

4.2.2.1.1. Adenomas

Los adenomas suelen estar encapsulados, son visibles macroscópicamente ya que varían de 1 a 6 cm. Microscópicamente predominan células fasciculares pero pueden encontrarse células de la zona reticular (Feldman y Nelson, 2007).

4.2.2.1.2. Carcinomas

Son de gran tamaño pudiendo alcanzar el tamaño del riñón. Macroscópicamente pueden no estar encapsulados pero son hipervascularizados. Son comunes la hemorragia, necrosis y degeneración quística. Histológicamente varían; pueden ser benignos o exhibir pleomorfismo considerable. La invasión vascular o capsular predice un comportamiento maligno. Pueden invadir estructuras locales o hacer metástasis por vía hematológica (Reusch, 2007a; Feldman y Nelson, 2007b).

4.2.2.2. Hiperplasia adrenocortical nodular

A nivel macroscópico se aprecian múltiples nódulos en la corteza adrenal. Estos son amarillos y al examen histopatológico se asemejan a las células claras de la zona fascicular normal. Puede ser ocasionada por la secreción crónica en exceso de ACTH causada por hiperadrencortisolismo dependiente de la hipófisis. (Feldman y Nelson, 2007).

4.2.2.3. Hiperplasia macronodular bilateral

4.2.2.4. Receptores ilegítimos

Vuorenoja y col. (2007) describieron receptores aberrantes para LH y GIP. La mutación del receptor puede ser en la zona fascicular o arcuata.

La presencia de receptores anómalos en la adrenal originan la hiperplasia macronodular adrenal. Esta se caracteriza por la síntesis de cortisol independientemente de la regulación de ACTH (Castillo y col., 2006).

4.2.3. Etiopatogenia del Síndrome de Cushing

En la Unidad de Endocrinología del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, el Síndrome de Cushing representa el 23% de los casos endocrinológicos atendidos, siendo la segunda enfermedad endócrina luego del hipotiroidismo. Del porcentaje referido el 83% son pituitarios dependientes, provocados por el adenoma productor de corticotropina (ACTH) o corticotropinoma (Enfermedad de Cushing o Hiperadrenocorticismos pituitario dependiente). Otro 16% del SC es causado por adenomas (45%) o carcinomas (55%) de la glándula adrenal y el 1% restante es causado por la presencia de receptores anómalos en la adrenal, dando origen a la hiperplasia macronodular adrenal. Esta se caracteriza por la síntesis de cortisol independiente de la regulación de la ACTH (Castillo y col., 2006).

La causa más frecuente en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco (Chile) es la iatrogénica y se presenta en animales que han sido medicados con dosis excesivas o por tiempos prolongados para el tratamiento del prurito de cualquier etiología. La segunda causa en Chile es la Enfermedad de Cushing (corticotropinomas 80-85% de los Cushing espontáneos), donde hay un aumento de la secreción de hormona estimulante de la corteza adrenal (ACTH) provocando hiperplasia bilateral de las adrenales con el consiguiente aumento en la producción de cortisol. En tercer lugar, está el tumor adrenocortical funcional que segrega cortisol independientemente de la acción de la ACTH. Por último, existen pocos casos de secreción ectópica de ACTH que se observa en el linfosarcoma y neoplasias bronquiales. (Matamoros y col., 2002).

4.2.3.1 Enfermedad de Cushing (SC dependiente de la hipófisis)

La anomalía más corriente en el Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis, es que la frecuencia y amplitud de los pulsos secretorios de ACTH son excesivos en forma crónica. La hipersecreción crónica de ACTH lleva a una excesiva secreción de cortisol causando hiperplasia adrenocortical. El mecanismo de retroalimentación negativa inhibidor de la ACTH es ineficiente, sosteniéndose el hipercortisolismo (Feldman y Nelson, 2007).

El Síndrome de Cushing crónico suprime la función hipotalámica y secreción de CRH, por lo tanto se pierde el control hipotalámico sobre la secreción de ACTH (Reusch, 2007).

Además de los efectos sistémicos, los glucocorticoides en exceso inhiben la función hipotalámica e hipofisaria normal, incluidas la liberación de TSH, GH y gonadotropinas (LH y FSH). Esta inhibición de la secreción de estas hormonas trópicas produce hipotiroidismo secundario reversible (TSH) (también por disminución del pasaje de T3 a T4), falta de ciclos o atrofia testicular (FSH y LH) y escaso crecimiento en cachorros (GH), aunque es más raro (Feldman y Nelson, 2007).

4.2.3.2. Tumor adrenal (TAF)

Los tumores adrenocorticales primarios, tanto adenomas como carcinomas, en apariencia desarrollan en forma autónoma (Feldman y Nelson, 2007).

Entre el 15 y 20% de los perros con hiperfunción corticoadrenal de aparición natural tienen un tumor corticoadrenal funcional, que secreta cortisol independientemente de la regulación hipofisaria. El cortisol inhibe a la CRH en el hipotálamo y a la ACTH en la hipófisis. El resultado de esta retroalimentación negativa prolongada provoca la atrofia cortical de la glándula adrenal no implicada y atrofia de todas las células normales de la glándula adrenal afectada (Reusch, 2007).

La secreción de cortisol dada por los tumores adrenocorticales es episódica y aleatoria. En la mayoría o casi la mayoría, estos tumores parecen conservar los receptores para ACTH, ya que responden a la ACTH exógena con la síntesis y secreción de cortisol. Estas neoplasias no suelen responder a la manipulación del eje hipotálamo hipofisario con agentes farmacológicos como la dexametasona (Feldman y Nelson, 2007).

La diferenciación de tumores malignos y benignos solo es sencilla si estos afectan la cápsula o vasos (Reusch, 2007).

4.2.3.3. Tumores hipofisarios y corticoadrenales simultáneos

Esta etiología es extremadamente rara en perros. Solamente se han encontrado 17 casos (Reusch, 2007).

La evaluación endocrina de estos perros ha identificado Síndrome de Cushing. Sin embargo, los estudios para distinguir entre Síndrome de Cushing por tumor adrenal y Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis brindaron resultados confusos y contradictorios (Feldman y Nelson, 2007).

4.2.3.4. Hiperplasia nodular adrenocortical

El 5 al 10% de los casos de Síndrome de Cushing son representados por perros con hiperplasia adrenocortical nodular bilateral. Una o ambas adrenales suelen estar agrandadas presentando nódulos variables en la corteza. La patogenia de este síndrome es incierta, aunque casi todos los animales se consideran representativos de una variante anatómica del Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis (Feldman y Nelson, 2007).

Existe otro tipo de hiperplasia nodular adrenal denominado "hiperplasia adrenal nodular masiva" el cual es independiente de ACTH y se caracteriza por

presentar grandes nódulos bilaterales que secretan grandes cantidades de cortisol. Esto señala que pueden existir factores diferentes a la ACTH que podrían inducir la secreción del cortisol (Reusch, 2007).

4.2.4. Signos clínicos

Los efectos gluconeogénicos, lipolíticos, catabólicos proteicos, antiinflamatorios e inmunosupresores combinados de los glucocorticoides sobre los diversos sistemas corporales derivan en los signos clínicos de dicha enfermedad. La enfermedad cursa de forma lenta e insidiosa. Antes de establecerse el diagnóstico, se observan algunos de los signos clínicos (Feldman y Nelson, 2007).

Los animales afectados suelen mantenerse estables, pero pueden presentar signos llamativos. Estos varían desde leves a graves lo que depende de la duración de la enfermedad y del grado de exceso del cortisol.

Los signos más comunes, de mayor a menor incidencia, son:

- Poliuria y polidipsia,
- Alopecia,
- Abdomen en péndulo,
- Hepatomegalia,
- Polifagia,
- Debilidad muscular,
- Anestro,
- Atrofia muscular,
- Comedones,
- Piel fina e inelástica,
- Hiperpigmentación,
- Jadeo,
- Atrofia testicular,
- Calcicosis cutánea,
- Parálisis del nervio facial.

Puede presentarse un único signo, o todos. Los perros que desarrollan la enfermedad en el primer año de vida, presentan ganancia de peso y retraso del crecimiento además de los signos citados (Frank y col., 2006; Reusch, 2007).

4.2.5. Casuística

El Síndrome de Cushing canino se da sobre todo en hembras adultas mayores de 6 años. Los perros con Síndrome de Cushing causado por tumores adrenales suelen ser mayores que los que padecen hiperadrencorticismo dependiente de la hipófisis (Feldman y Nelson, 2007).

En cuanto a la raza, el Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis se da sobre todo en animales chicos menores de 20 Kg. como caniches, dachshund y terriers. El Síndrome de Cushing dependiente de la adrenal ocurre con mayor frecuencia en perros que pesan más de 20 kg. (Feldman y Nelson, 2007). En Argentina se ve principalmente en mestizos y en segundo

lugar en caniches, daschshund y schnauzer (Castillo, V, 2009. Comunicación personal).

En cuanto al sexo y la edad, en una muestra de 42 animales, se demostró que el 64% de los perros con Síndrome de Cushing eran hembras; y que la incidencia de la enfermedad aumenta con la edad (Galleli, M, 2009. Comunicación personal).

4.3. Diagnóstico

4.3.1. Clínica

El diagnóstico clínico es la primera aproximación al diagnóstico y es de gran valor ya que la patología tiene signos patognómicos.

4.3.2. Análisis de laboratorio

A través de análisis de laboratorio de rutina se colabora en el diagnóstico. Podrían ser sugerentes de esta patología datos como neutrofilia, linfopenia y eosinopenia ($<100/\text{mm}^3$). En la orina se observa proteinuria y glucosuria, lo más relevante es la densidad urinaria (Hipostenuria ≤ 1010). La bioquímica sérica muestra la FAS usualmente aumentada en perro y es la prueba bioquímica inicial más sensible para esta enfermedad. Esto es porque los corticoides inducen la producción de "FAS-inducida por corticoide" en esta especie. Sin embargo, un nivel normal de FAS no excluye el diagnóstico de esta enfermedad e incrementos de esta enzima se presentan en otras condiciones patológicas: en gatos puede estar ligeramente incrementada con Síndrome de Cushing debido a la colestasis (almacenamiento de glicógeno en el hígado); sin embargo, debido a que esta enzima no es inducida por los corticoides en el gato, el valor es a menudo normal y valores altos no necesariamente sugieren Síndrome de Cushing. Además muestra hiperglicemia, aumentos moderados de colesterol, y ALT aumentada (Reusch, 2007a; Feldman y Nelson, 2007b; Herrtage, 2007c).

Las concentraciones de triglicéridos y colesterol, normalmente están aumentadas debido a la estimulación de la lipólisis por parte de los glucocorticoides. El colesterol y los triglicéridos no son un hallazgo específico ya que también aumentan en el hipotiroidismo, diabetes mellitus y trastornos colestásicos del hígado, y en todos ellos puede ser un diagnóstico diferencial. La hipertrigliceridemia también se da, aunque menos frecuentemente y es importante ya que la lipemia resultante puede interferir en una valoración precisa de cantidad de parámetros de laboratorio. Los niveles basales de T4 y T3 suelen ser bajos en el Síndrome de Cushing. Sumado a esto, radiológicamente se observa hepatomegalia, osteoporosis en vértebras y costillas (poco común en perros), calcificaciones en riñón, pulmón y piel (Thuróczy y col., 1998; Matamoras y col., 2002; Herrtage, 2007).

Según Schatz y col. (2001) medir los metabolitos del cortisol en materia fecal sería un buen método no invasivo para monitorear el stress en carnívoros y evaluar la función adrenocortical (Schatz y col. 2001).

4.3.3. Laboratorio endócrino

El diagnóstico confirmatorio se realiza a través de las pruebas endocrinas de funcionalidad de la corteza adrenal:

4.3.3.1 Ratio cortisol/creatinina en orina

La evaluación del ratio de cortisol/creatinina ha demostrado ser un test fácil y valioso para el diagnóstico de SC.

Midiendo el cortisol en la orina en una muestra por la mañana (lo ideal es recolectar la orina de 24 horas), la concentración reflejará la emisión de cortisol durante un período de varias horas, ajustando, de ese modo, la fluctuaciones de las concentraciones de cortisol en el plasma. La concentración de cortisol en la orina aumentan con las concentraciones circulantes altas. Relacionando la concentración de cortisol en orina con la concentración de creatinina en orina proporciona una corrección de cualquier diferencia de la concentración en la orina.

La orina se recoge en la mañana para hacer las estimaciones de cortisol y creatinina.

El ratio cortisol/creatinina en orina se determina dividiendo la concentración de cortisol en la orina ($\mu\text{mol/L}$) entre la concentración de creatinina en orina ($\mu\text{mol/L}$).

El ratio de referencia en perros normales es $<10 \times 10^{-6}$.

El ratio cortisol/creatinina en orina está aumentado por encima de lo normal en perros con SC. Sin embargo, el ratio también aumenta en algunos perros con enfermedad no adrenal. Por esta razón, mientras este test fácil parece altamente sensible detectando SC en perros, no es específico.

El ratio cortisol/creatinina en orina no diferencia de manera fiable entre el SC independiente del dependiente a menos que el ratio exceda 100×10^{-6} , cuando es probable que el perro sufra un SC ACTH dependiente (Herrtage, 2007).

4.3.3.2. Prueba de estimulación con ACTH

Usualmente esta prueba se realiza a las 8:00 ó 9:00 horas para minimizar las variaciones diurnas en las concentraciones de cortisol.

- a. Se colecta muestra de sangre (suero o plasma heparinizado) para una concentración basal de cortisol.
- b. Se inyecta ACTH: ACTH gel IM, 2.2 unidades/kg (dosis máxima 40 UI); ACTH sintética (Cosyntropin® o Cortrosyn®), 250 μg /animal IV o IM y en el caso de perros que pesen menos de 5 Kg y del gato se utiliza la mitad de la dosis .
- c. Se colecta muestra de sangre para medir niveles de cortisol post-ACTH, a los 30 a 60 min en el caso del perro, y a 1 y 2 horas en el caso del gato (estos últimos presentan un tiempo de respuesta más variable). Si utiliza Cosyntropin® o Cortrosyn®, la muestra de sangre se colecta una hora después tanto en perros como gatos.

Un perro normal presenta concentraciones basales de cortisol del orden de 40-180 nmol/L (1,45 – 6.52 µg/dl) y un valor de cortisol post-ACTH de 230-570 nmol/L (8.33 – 20.6 µg/dl) (valores varían de acuerdo al laboratorio usado). Los animales con síndrome de Cushing presentan altos niveles de cortisol post-inyección (más de 700 nmol/L) (17 µg/dl). Hay que tomar en cuenta que el estrés en cualquier especie puede causar un aumento moderado en los niveles de cortisol (300 nmol/L en caninos) (10,89 µg/dl). Los pacientes que clínicamente presentan un Síndrome de Cushing iatrogénico se manifiestan al nivel de resultados de laboratorio con hipoadrenocorticismo (debido a una atrofia de las glándulas adrenales por los corticoides exógenos) (Matamoros y col., 2002; Herrtage, 2007).

Al administrar Cosyntropin® a una dosis de 5 µg/kg intravenoso, se estimula la máxima producción de cortisol, hormonas sexuales de origen adrenal y los intermediarios esteroideos adrenocorticales 1 hora post administración (Frank y col., 2004).

4.3.3.3. Prueba de supresión con Dexametasona a dosis baja

Se basa en la inhibición que los glucocorticoides ejercen, a través de la retroalimentación negativa, sobre la hipófisis para disminuir la secreción de ACTH. Lo que se mide es el cortisol sérico (Matamoros y col., 2002).

En los perros con tumor adrenocortical funcional, la secreción de ACTH hipofisaria se inhibe como resultado de la secreción autónoma de cortisol en el tumor. La administración de dexametasona no ejerce efecto sobre la hipófisis continuando la secreción de cortisol. La prueba de inhibición con dosis baja de dexametasona ampliada se puede usar para identificar a perros con Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis según tres criterios: una concentración de cortisol a las 4 horas inferior a 1,4 µg/dl, una concentración de cortisol a las 4 horas inferior al 50% de la concentración basal de cortisol, y una concentración de cortisol a las 8 horas inferior al 50% de la concentración basal de cortisol pero igual o superior a 1,4 µg/dl. Al cumplirse uno o más de estos criterios es probable que el perro presente Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis. El 25% de los perros con Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis tienen concentraciones de cortisol a las 4 horas inferiores a 1,4 µg/dl. El 60% presenta una concentración de cortisol a las 4 horas inferiores al 50% de la concentración basal de cortisol, y el 25% una concentración de cortisol a las 8 horas inferior al 50% de la basal (Reusch, 2007).

- a. Se colecta muestra de sangre (suero o plasma heparinizado) para una concentración basal de cortisol.
- b. Se inyecta Dexametasona a dosis bajas para el perro (IV, 0.01 mg/kg) o dosis altas para el gato (IV, 0.1 mg/kg).
- c. Se colecta muestra de sangre para medir niveles de cortisol post-Dexametasona a las 4 y 8 horas (Matamoros y col., 2002).

Un animal normal reaccionará a estas dosis de Dexametasona reduciendo (retroalimentación negativa) el nivel de cortisol a las 4 y 8 horas. Un animal con Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis o tumor adrenocortical funcional no responderá al efecto negativo del glucocorticoide y el nivel de cortisol se mantendrá alto. Si un animal presenta una supresión temporal a las 4 horas pero “escapa” a la supresión a las 8 horas, nos permite sospechar un diagnóstico de Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis (Matamoros y col., 2002).

Hay que tomar en cuenta la siguiente aclaración: si el resultado de esta prueba, tanto como la de estimulación con ACTH, es normal, no podemos descartar la enfermedad con un 100% de certeza. En el perro la supresión con dosis baja de Dexametasona es 90-95% sensible y la estimulación con ACTH es sensible alrededor de 85% de los casos. Las ventajas de la segunda prueba son: a) es más corto (2 horas vs 8 horas) y b) es la única prueba que es útil para diagnosticar el Síndrome de Cushing clínico iatrogénico. En este caso, un nivel basal bajo de cortisol es observado junto con un cambio mínimo en la concentración después de la estimulación con ACTH. Estos pacientes pueden tener signos clínicos de Síndrome de Cushing, pero los resultados de laboratorio son consistentes con hipoadrenocorticismo. Por lo tanto, la estimulación con ACTH es particularmente útil si estamos ante un paciente nuevo o que no sabemos qué fármacos ha recibido. En resumen, es mejor realizar ambas pruebas para diagnosticar Síndrome de Cushing. Algunos autores recomiendan realizar estas pruebas en días separados o en combinación (Matamoros y col., 2002).

4.3.3.4. Supresión con Dexametasona a dosis alta

Este test ya no se considera fiable pero puede estar indicado en aquellos casos en los que el diagnóstico de Síndrome de Cushing se ha establecido mediante un test diagnóstico, pero no se ha determinado la diferenciación entre Síndrome de Cushing ACTH dependiente o independiente, mediante la medición de ACTH o la imagen diagnóstica. La dosis alta de dexametasona debería inhibir la secreción de ACTH hipofisaria, a través del feedback negativo, en el SC ACTH dependiente y, con ello, suprimir las concentraciones de cortisol. La supresión de cortisol indica SC ACTH dependiente. Los tumores adrenocorticales son autónomos y, por ello, no se suprime el cortisol. Sin embargo, se ha demostrado que el 20-30%, aproximadamente, de casos ACTH dependientes no se suprimirán con este test, posiblemente porque la patología implica los pares intermedios, y por esta razón, una falta de supresión no determina la causa del SC. Además, este test de supresión con dexametasona a dosis alta no diferencia los adenomas de los carcinomas adrenocorticales (Herrtage, 2007).

- a. Tomar una muestra de sangre para la determinación de cortisol.
- b. Inyectar 0.1 mg/kg de dexametasona vía intravenosa. Algunos autores recomiendan 1,0 mg/kg.

- c. Tomar dos muestras post dexametasona, una a las 3-4 horas y la segunda a las 8 horas después de la administración (Herrtage, 2007).

4.3.3.5. Prueba de ACTH endógena

Esta es una prueba discriminatoria ideal. Si el animal tiene Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis, los niveles de ACTH estarán elevados. Si el animal tiene tumor adrenocortical funcional, los niveles de ACTH estarán bajos, ya que las concentraciones altas de cortisol inhiben por retroalimentación negativa la liberación de ACTH por parte de la adenohipófisis (Matamoros y col., 2002).

Desafortunadamente, hay que tomar en cuenta que en algunas ocasiones podemos obtener resultados de poco valor diagnóstico, ya que la secreción episódica de ACTH en el perro normal se superpone con los valores de perros con Síndrome de Cushing. Además, la ACTH es poco estable y se necesitan cuidados especiales para recolectar la muestra (Matamoros y col., 2002). Sumado a esto, la secreción de ACTH por el tumor es variable, tiene momentos de latencia y otros más activos (Castillo, V, 2009. Comunicación personal). Se colecta la muestra en tubos conteniendo EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se centrifuga inmediatamente. Posteriormente se coloca el sobrenadante en tubos plásticos y se congela o se mantiene refrigerada la muestra con paquetes de gel congelado en un recipiente aislante para el envío inmediato al laboratorio. La cantidad mínima de muestra es de 1 ml. Si la muestra está hemolizada no se puede realizar la prueba. Finalmente, el análisis de ACTH debe ser validado para su uso en caninos (Matamoros y col., 2002).

4.3.4. Test de estimulación con desmopresina

La desmopresina es un análogo sintético del péptido hipotalámico vasopresina y se une a receptores hipofisarios para vasopresina (V3). Dicho receptor se sobre expresa en tumores corticotropos hipofisarios y la inyección de desmopresina induce una marcada liberación de ACTH y cortisol en pacientes humanos con Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis, pero no en aquellos con Síndrome de Cushing dependiente de tumores adrenales. Se investigaron los efectos de la desmopresina sobre los niveles de cortisol sérico en 80 perros sospechosos de padecer Síndrome de Cushing. Se concluyó que la administración de desmopresina provoca un aumento significativo del nivel sérico de cortisol en pacientes con enfermedad de Cushing dependiente del hipotálamo, pero no en aquellos perros con tumor adrenal o enfermedades que se parecen al Síndrome de Cushing. La inyección intravenosa no se asoció con reacciones adversas. Debido al pequeño número de pacientes con neoplasias adrenales es muy pronto aun para recomendar este test en la práctica clínica, pero los resultados fueron muy prometedores (Zeugswetter y col., 2008). El costo es altísimo.



4.3.5. Diagnostico por imagen

Los avances en el diagnóstico por imagen han mejorado la habilidad de los veterinarios para identificar la causa de SC de manera que el tratamiento pueda dirigirse más específicamente a cada paciente.

Sin embargo encontrar una masa pituitaria o adrenal no implica la presencia de un tumor funcional, es por esta razón que el diagnóstico por imagen siempre debería interpretarse junto con los signos clínicos y los resultados de las pruebas endócrinas (Herrtage, 2007).

4.3.5.1. Radiografía

Es recomendable el exámen radiográfico del tórax y del abdomen en todos los casos de sospecha o prueba de SC, aunque solo se obtiene información diagnóstica positiva en un pequeño numero de casos, que son aquellos que el agrandamiento adrenal puede detectarse, pero es practicamente imposible (Herrtage, 2007).

4.3.5.2. Ecografía abdominal

La ecografía abdominal tambien puede detectar tumores adrenocorticales. La ecografía no puede diferenciar un tumor adrenocortical funcional de un tumor no funcional, un feocromocitoma, una lesión metastásica o un granuloma. Por esta razón los signos clinicos y los resultados del test endocrino son importantes para una completa interpretación de los hallazgos de la imagen (Herrtage, 2007).

4.3.5.3. Tomografía computada y resonancia magnetica

La tomografía computada y la resonancia magnética han demostrado ser útiles para el diagnóstico de tumores adrenales, hiperplasia adrenal y tumores pituitarios grandes o pequeños pero ambas técnicas son caras y no siempre están disponibles.

Más del 50% de los perros con SC dependiente de ACTH tienen una masa pituitaria detectable en una resonancia magnética (Herrtage, 2007).

4.3.5.4. Diagnóstico de tumor hipofisario usando imagen por resonancia magnética aumentada en gadolinium

Las técnicas imagenológicas avanzadas como tomografía computada o imagen por resonancia magnética son los mejores métodos para obtener un diagnóstico de un tumor hipofisario en perros con Síndrome de Cushing dependiente de la hipófisis. Además, estas técnicas imagenológicas son requeridas para evaluar el tamaño y la localización del tumor pituitario cuando se planea remover la masa tumoral quirúrgicamente, o bien la glándula entera. Se describió el caso de un golden retriever de 11 años con Síndrome de Cushing dependiente de la pituitaria como resultado de un tumor hipofisario funcionante, visualizado por resonancia magnética usando gadolinium como agente de contraste (Hernández y col., 2006).

5. OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del sexo en la respuesta a los test de ACTH y la dexametasona a dosis baja en las concentraciones de cortisol en caninos sanos.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Diseño Experimental

Se utilizaron siete perros Cocker Spaniel adultos sanos, 3 machos y 4 hembras de la Unidad de Nutrición Canina, Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria. El peso promedio de los animales es 11.9 ± 0.7 Kg. Los perros fueron alimentados durante siete días a las 6 de la tarde con sudieta habitual (Excellent, Purina).

Previo a la prueba de supresión con dexametasona a dosis baja se tomaron muestras de sangre (2 horas previas a la administración) cada 1 hora. Luego se inyectó la droga a una dosis de 0,01 mg/kg IV a cuatro de los animales sanos y una solución salina a los otros 3 perros (hora 0). La extracción de sangre se realizó de manera seriada cada 1 horas comenzando 2 horas antes de la administración de la droga, hasta 9 horas post inyección. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena safena y se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. El suero se almacenó a -20° C hasta las determinaciones hormonales. El ensayo se repitió una semana después invirtiendo los animales, es decir, los controles fueron tratados y viceversa.

Luego de 15 días, se realizó la prueba de estimulación con ACTH. Previo a la estimulación se extrajeron muestras de sangre (2 horas previas a la administración) cada 1 hora. Luego se inyectó ACTH a dosis de 0.01 mg/kg IV a cuatro de los animales sanos y una solución salina a los 3 restantes (hora 0). Luego se extrajo sangre de manera seriada cada 1 hora, hasta 9 horas post inyección. Las muestras también se obtuvieron de la vena safena y se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. El suero se almacenó a -20° C hasta las determinaciones hormonales.

6.2. Determinaciones hormonales

La determinación de cortisol en plasma se realizó por radioinmunoanálisis en fase sólida utilizando un kit comercial (Diagnostic Product Corporation). La sensibilidad del ensayo fue de aprox. 0,48 µg/dL.

6.3. Análisis estadístico

Las variables fueron analizadas utilizando el procedimiento mixto (PROC MIXED de SAS®) incluyendo en el modelo estadístico el tratamiento, el sexo de los animales y la hora de muestreo. Se consideró significativo cuando $P < 0.05$.

Los coeficientes de variación intra-ensayo para los controles bajos (27.6 nmol/l) y medios (138.0 nmol/l) fueron 3.4% y 5.3% respectivamente.

7. RESULTADOS

7.1. Efectos del test con ACTH y dexametasona a dosis baja

El tiempo de muestreo, el tratamiento y su interacción tuvieron un efecto significativo en las concentraciones de cortisol ($P < 0.0001$) para todos los efectos. Las concentraciones de cortisol en los perros tratados con dexametasona disminuyeron una hora posterior a la inyección y permanecieron bajos por 3 horas, luego de las cuales las concentraciones de cortisol aumentaron. Los perros testeados con ACTH mostraron un incremento en los niveles de cortisol en la primera hora después del muestreo y hasta 3 horas posteriores a la inyección. No se encontraron diferencias en los niveles basales 4 horas después de la inyección (Figura 1). El tiempo de muestreo no tuvo efecto en los niveles de cortisol de los perros pertenecientes al grupo control (Figura 1).

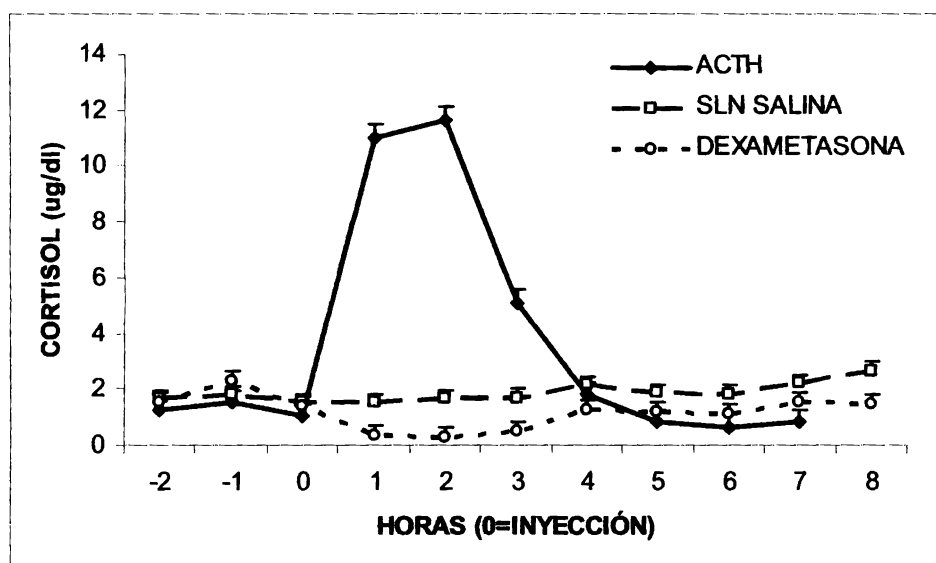


Figura 1: Concentración de cortisol en sangre luego del tratamiento con ACTH, dexametasona y solución salina (SLN Salina) en caninos sanos ($n=7$).

7.2. Efectos del sexo

Se encontró una interacción significativa entre **sexo*tratamiento** ($P < 0.0001$) y **sexo*tratamiento*tiempo de muestreo** ($P=0.0095$) en los niveles de concentración de cortisol. En los machos tratados con dexametasona los niveles de cortisol disminuyeron una hora post inyección y retornaron a los niveles pre tratamiento 3 horas más tarde. En las hembras el descenso fue más pronunciado y prolongado, volviendo a los niveles pre tratamiento 6 horas posteriores a la inyección (Figura 2). Esto llevó a que los niveles de cortisol

fueran menores en hembras 4 y 5 horas después de la inyección con dexametasona.

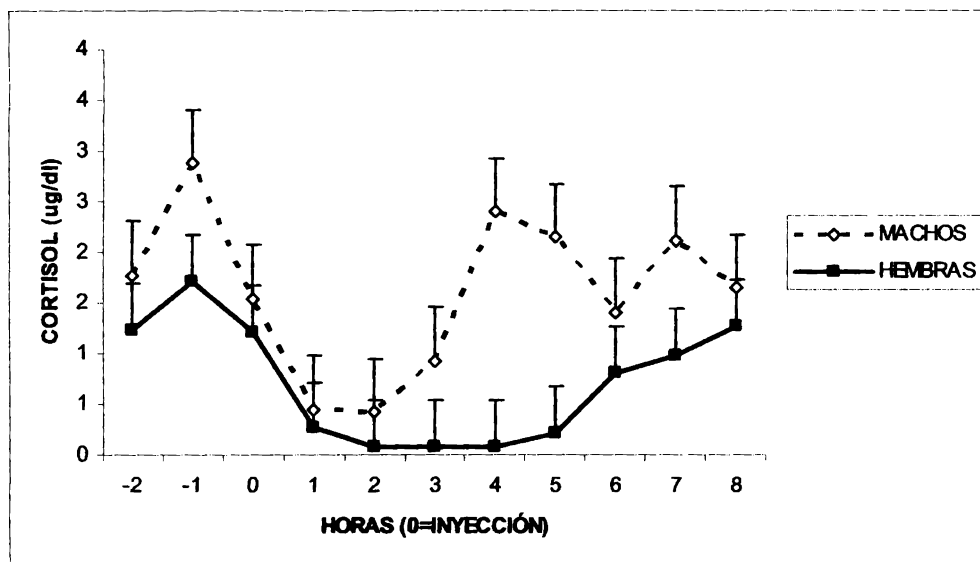


Figura 2: Concentración de cortisol en sangre luego del tratamiento con dexametasona en machos (n=3) y hembras (n=4) sanos.

El aumento en los niveles de cortisol desde una a dos horas posteriores a la inyección de ACTH fue significativamente más alto en hembras que en machos ($P < 0.001$) (Figura 3).

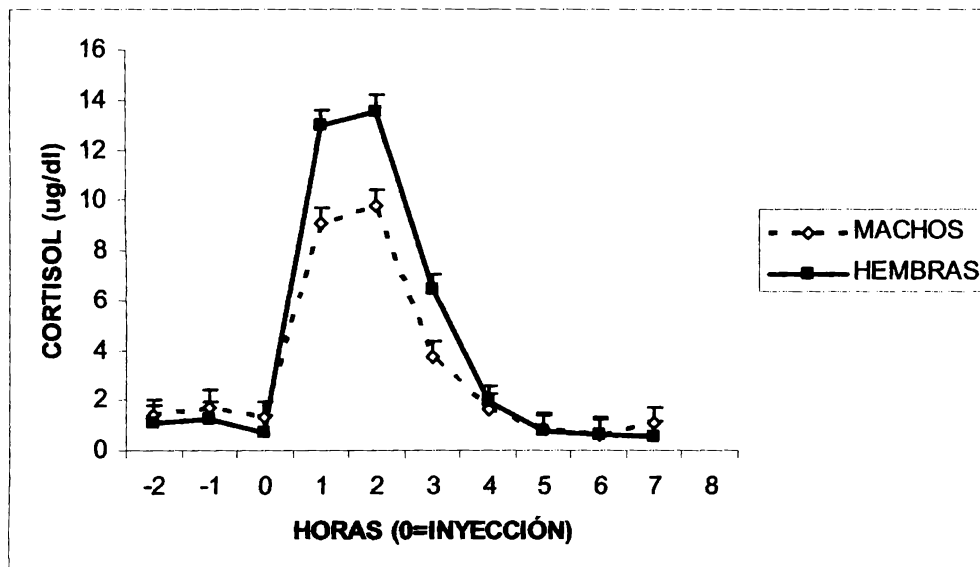


Figura 3: Concentración de cortisol en sangre luego del tratamiento con ACTH en machos (n=3) y hembras (n=4) sanos.

Los perros control no mostraron diferencias entre sexos (Figura 4)

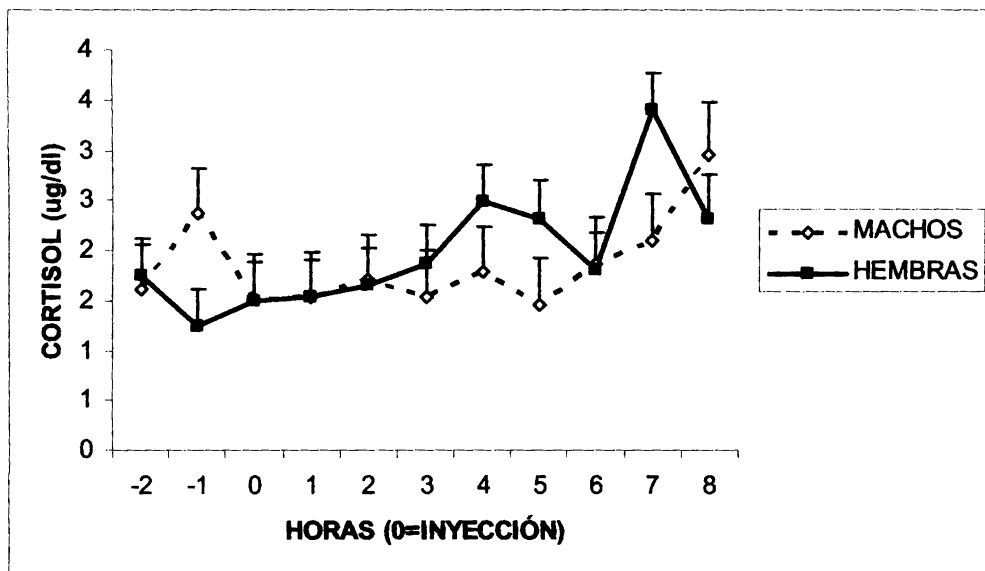


Figura 4: Concentración de cortisol en sangre luego del tratamiento con solución salina en machos (n=3) y hembras (n=4) sanos.

8. DISCUSION



Se ha reportado un ritmo circadiano para la secreción de cortisol en humanos, monos y ratas, pero esto es contradictorio en perros (Kemppainen y col., 1984; Orth y col., 1988; Castillo y col., 2009). En el presente estudio, las concentraciones de cortisol fueron medidas cada una hora por diez horas y no se observaron variaciones.

Se observaron efectos del tratamiento en las concentraciones de cortisol. Los perros tratados con dexametasona presentaron un descenso en la primera hora post inyección que duró hasta tres horas post inyección. Feldman y Nelson (2007) encontraron una supresión similar de la secreción de cortisol luego del tratamiento con dexametasona, en perros que se muestreaban cada una hora, aunque los niveles permanecían bajos hasta ocho horas post inyección. Esta diferencia no puede ser atribuida a la dosis, pero pudo deberse al adyuvante y/o al manejo de los animales (por ejemplo: raza, horas de ayuno). La respuesta del cortisol a la estimulación con ACTH y a la inhibición con dexametasona fue similar a otros trabajos considerando no solamente la máxima concentración de cortisol después del tratamiento, sino que también la duración de la respuesta (Hansen y col., 1994; Peterson y col., 1996; Feldman y Nelson, 2007). En el presente estudio, los perros tratados con ACTH mantuvieron los niveles de cortisol elevados hasta tres horas post inyección, mientras que Hansen y col. (1994), muestreando cada media hora, encontraron un aumento significativo, similar al nuestro, en los primeros 30 minutos post inyección y máximas concentraciones 1,5 horas después de la inyección. Su muestreo terminó a las 2,5 horas y las concentraciones de cortisol, aunque inferiores a las existentes 1,5 horas post inyección, eran todavía diferentes a las basales. Aunque en nuestro estudio utilizamos un pequeño número de animales, debe resaltarse que la frecuencia del muestreo y las concentraciones de cortisol no pueden ser atribuidas al stress del procedimiento de muestreo.

No encontramos diferencias entre sexos en los niveles basales de cortisol lo que se asemeja a lo encontrado por Reimers y col. (1990) quienes no encontraron efecto del sexo en las concentraciones de cortisol en perros sanos. Este estudio demostró que el sexo afecta la respuesta del cortisol de los animales cuando son estimulados con ACTH o inhibidos con dexametasona.

La inhibición de la secreción de cortisol producida por la dexametasona fue diferente de acuerdo al sexo, ya que la inhibición duro mas en hembras que en machos. No encontramos ningún informe que reportara la diferencia en la respuesta por sexo en perros tratados con dexametasona. En humanos, la sensibilidad de los glucocorticoides, medida a traves del test de supresión con dexametasona y el test combinado de supresión con dexametasona/estimulación con CRH (Dex-CRH) utilizado para evaluar el grado de desregulación del eje hipotalamo-hipofiso-adrenal en pacientes con depresión unipolar, ha mostrado ser afectada por el sexo (Binder y col., 2009). Queda por dilucidar si la inhibición prolongada de la dexametasona en la secreción de cortisol en perros es debida a sensibilidad diferencial del hipotálamo/hipófisis a los glucocorticoides.

La respuesta a la ACTH, en términos de secreción de cortisol, fue también afectada por el sexo ya que las hembras presentaron una concentración de cortisol más alta que los machos. Esto coincide con informes en otras especies: rata (Handa y col., 1994); oveja (van Lier y col., 2003). Ya que el tratamiento fue con ACTH exógeno, podemos sugerir que la respuesta periférica de las glándulas adrenales a la ACTH tiene una regulación diferente en cada sexo. No encontramos trabajos que reportaran sensibilidad diferencial de las glándulas adrenales a la ACTH en perros. Por el otro lado, se ha reportado la existencia de receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) en las glándulas adrenales de la oveja y encontramos una sensibilidad variable a los estrógenos ya que los niveles de ER son diferentes dependiendo del sexo y del estado gonadal, las hembras tienen los niveles de ER más altos que los machos (van Lier y col., 2003). Estos hallazgos indican que los estrógenos podrían afectar la esteroidogénesis directamente en la corteza adrenal y sugieren que los estrógenos son en parte responsables por las diferencias sexuales en la secreción de cortisol en la oveja.

9. CONCLUSIONES

Con este trabajo pudimos demostrar que la respuesta de las glándulas adrenales, frente a los test de estimulación con ACTH como a la supresión con dexametasona en caninos sanos varía con el sexo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Behrend, E.N., Kemppainen, R.J. (2001). Diagnosis of Canine Hyperadrenocorticism. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 31(5):985–1003.
2. Binder, E.B., Künzel, H.E., Nickel, T., Kern, N., Pfennig, A., Majer, M., Uhr, M., Ising, M., Holsboer, F. (2009). HPA-axis regulation at in-patient admission is associated with antidepressant therapy outcome in male but not in female depressed patients. *Psychoneuroendocrinology.* 34:99-109.
3. Canny, B.J., O'Farrel, K.A., Clarke, I.J., Tilbrook, A.J. (1999). The influence of sex and gonadectomy on the hypothalamo–pituitary–adrenal axis of the sheep. *J. Endocrinol.* 162:215–225.
4. Castillo, V.A., Wolberg, A., Ghersevich, M.C. (2006). Síndrome de Cushing subclínico en el perro. *Rev. Electrón. Vet.* 7(11). Disponible en: www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html. Fecha de consulta: 18/11/2009.
5. Castillo, V.A., Cabrera Blatter, M.F., Gómez, N.V., Sinatra, V., Gallelli M.F., Ghersevich, M.C. (2009). Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Res. Vet. Sci.* 86:223-229.
6. Chastain. C.B., Ganjman, V.K. (1990). *Endocrinología clínica de los animales de compañía*, Buenos Aires, Ed. Inter-Vet S.A., 526p.
7. Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. (2002). Glándulas Endócrinas. En: Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. (ed.). *Anatomía Veterinaria*. 2a. ed., México, Ed. McGraw Hill Interamericana, pp. 227-233.
8. Feldman, E.C., Nelson, R.W. (2007). Hiperadrenocorticism Canino (Síndrome de Cushing). En: Feldman, E.C., Nelson, R.W., (ed.). *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina*. 3a. ed., Buenos Aires, Inter-Médica, pp. 341-345.
9. Ferrini, M., Magariños, A.M., De Nicola, A.F. (1990). Oestrogens down-regulate type I but not type II adrenal corticoid receptors in rat anterior pituitary. *J. Steroid Biochem.*; 35:671–677.
10. Frank, L., Davis, J., Oliver, J. (2004). Serum concentrations of cortisol, sex hormones of adrenal origin, and adrenocortical steroid intermediates in healthy dogs following stimulation with two doses of cosyntropin. *Am. J. Vet. Res.*; 65(12):1631-1633.

11. Frank, L. (2006) Comparative dermatology - Canine endocrine dermatoses. *Clin. Dermatol.*; 24(4):317-325.
12. Handa, R.J., Burgess, L.H., Kerr, J.E., O'Keefe, J.A. (1994). Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm. Behav.*; 28:464-476.
13. Hansen, B., Kemppainen, R.J., MacDonald, J.M. (1994). Synthetic ACTH (Cosyntropin) stimulation test in normal dogs: Comparison of intravenous and intramuscular administration. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*; 30:38-41.
14. Haubenhofer, D., Möstl, E., Kirchengast, S. (2005). Cortisol concentrations in saliva of humans and their dogs during intensive training courses in animal-assisted therapy. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*; 92(3):66-73.
15. Hernández, C.A., Alzate, G. (2006). Pituitary tumor diagnosis using gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in a dog with hyperadrenocorticism. A case report. *Rev. Col. Cienc. Pec.*; 19:437-441.
16. Herrtage, M. (2007). Hiperadrenocorticismo Canino. En: Mooney, C.T., Peterson, M.E., (ed.). *Manual de endocrinología en pequeños animales*. 3a ed., Industrias Gráficas Ferre Olsina, pp. 217-247.
17. Kemppainen, R.J., Sartin, R.L. (1984). Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *J. Endocrinol.*; 103:219-225.
18. Martínez Franco, M., Domínguez Cherit, G., Rivero Sigarrosa, E. (2004). Función suprarrenal en pacientes críticamente enfermos. *Rev. Asoc. Mex. Med. Crit. Ter. Int.*; 18(1):11-16.
19. Matamoros, R., Gómez, C., Andaur, M. (2002). Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria. *Arch. Med. Vet.*; 34(2):167-182.
20. Moolchandani, A., Sareen, M., Vaishnav, J. (2004). Plasma cortisol (hydrocortisone) values in dogs. *J. Canine. Dev. Res.*; 4:60-61.
21. Orth, D.N., Peterson, M.E., Drucker, W.D. (1988). Plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptides and cortisol in normal dogs and dogs with Cushing's syndrome: diurnal rhythm and responses to various stimuli. *Endocrinol.*; 22:1250-1262.
22. Peterson, M.E., Wallace, M.S., Kerl, M.E. (1996). Dose-response relation between plasma concentrations of ACTH and cortisol after administration of incremental doses of cosyntropin for ACTH stimulation testing in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*; 10(3):186.

23. Reimers, T.J., Lawler, D.F., Sutaria, P.M., Correa, M.T., Erb, H.N. (1990). Effects of age, sex, and body size on serum concentrations of thyroid and adrenocortical hormones in dogs. *Am. J. Vet. Res.*; 51(3):454-457.
24. Reusch, C.E. (2007). Hiperfunción corticosuprarrenal. En: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (ed.). *Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del perro y el gato. Volúmen II. 6a ed.*, Madrid, Ed Elsevier España S.A. pp. 1592-1612.
25. Schatz, S., Palme, R. (2001). Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Vet. Res. Commun.*; 25(4):271-87.
26. Thuróczy, J., Balogh, L., Huszenicza, G., Jánoki, G.A., Kulcsár, M. (1998). Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs as compared to human diagnostic methods. Review article. *Acta Vet. Hung.*; 46(2):57-73.
27. van Lier, E., Pérez-Clariget, R., Forsberg, M. (2003). Sex differences in cortisol secretion alter administration of an ACTH analogue in sheep during the breeding and non-breeding Season. *Anim. Reprod. Sci.*; 79(1-2):81-92.
28. van Lier, E., Meikle, A., Bielli, A., Akerberg, S., Forsberg, M., Sahlin, L. (2003). Sex differences in oestrogen receptor levels in adrenal glands of sheep during the breeding season. *Domest. Anim. Endocrinol.*; 25(3):373-387.
29. Vuorenoja, S., Rivero-Muller, A., Küveri, S., Bielinska, M., Heikinheimo, M., Wilson, D.B., Huhtaniemi, I.T., Rahman, N.A. (2007). Adrenocortical tumorigenesis, luteinizing hormone receptor and transcription factors GATA-4 and GATA-6. *Mol. Cell. Endocrinol.*; 269:38-45.
30. Zeugswetter, F., Hoyer, M.T., Pagitz, M., Benesch, T., Hittmair, K.M., Thalhammer, J.G. (2008). The desmopressin stimulation test in dogs with Cushing's syndrome. *Domest. Anim. Endocrinol.*; 34:254-260.