

Terapia medica e monitoraggio terapeutico della sindrome di Cushing nel cane



La differenziazione tra ipercortisolismo ipofisario e surrenalico è essenziale per la scelta della strategia ottimale di trattamento terapeutico in corso di sindrome di Cushing. Attualmente la terapia medica d'elezione per l'ipercortisolismo è il trilostano, il quale permette il controllo della sintomatologia clinica nella maggior parte dei casi senza, tuttavia, portare ad una risoluzione della patologia. Ad oggi, la terapia con trilostano prevede principalmente due possibili metodi di monitoraggio, il test di stimolazione con ACTH e la misurazione della concentrazione del "cortisolo *prepill*" ciascuno dei quali presenta vantaggi e svantaggi. L'obiettivo della presente *review* è quello di approfondire le possibili opzioni terapeutiche oggi disponibili e quelle ancora oggetto di studio per il trattamento medico dell'ipercortisolismo spontaneo canino. Particolare attenzione verrà riservata alla terapia e al monitoraggio terapeutico del trattamento con trilostano.

INTRODUZIONE

L'ipercortisolismo spontaneo canino (HC) o sindrome di Cushing (SC) è una tra le endocrinopatie più frequentemente riscontrate nel cane. Nell'80-85% dei casi, l'HC è conseguente ad una ipersecrezione di ormone adrenocorticotropo (ACTH) secondario alla presenza di un adenoma ipofisario (PDH, *pituitary dependent hypercortisolism*). Nella maggior parte dei restanti casi si tratta invece di una forma ACTH non dipendente, legata ad una eccessiva secrezione di cortisolo da parte di una neoplasia surrenalica benigna o maligna (ADH, *adrenal-dependent hypercortisolism*). Il principale obiettivo del trattamento dell'HC canino è quello di raggiungere delle concentrazioni di cortisolo tali da ridurre/eliminare i segni clinici e prevenire le complicazioni a lungo termine della malattia, migliorando l'aspettativa e la qualità di vita del paziente. Per raggiungere tale scopo è di primaria importanza definire l'origine dell'HC (ipofisario vs surre-

nalico). Infatti, in corso di SC, le opzioni terapeutiche sono sia di tipo chirurgico che medico, e dipendono dalla sede. Il trattamento del PDH può essere finalizzato ad eliminare l'eccessiva sintesi di ACTH da parte della ghiandola ipofisaria. Ciò è possibile intervenendo chirurgicamente asportando l'intera ghiandola ipofisi. Nei casi di ADH, la surrenlectomia rappresenta la terapia d'elezione in quanto permette la rimozione del tumore responsabile dell'eccessiva produzione di cortisolo. In alternativa, i cani affetti da HC possono essere sottoposti a terapia medica che solitamente determina ottimi risultati ma non risulta, tuttavia, curativa. Per decidere quale sia l'approccio terapeutico migliore per il singolo paziente è necessario effettuare un'attenta va-



Stefania Golinelli,¹
Med Vet



Antonio Maria Tardo,¹
Med Vet



Federico Fracassi,¹
Med Vet, PhD,
Dipl. ECVIM-CA

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia, Bologna.

*Corresponding Author (stefania.golinelli3@unibo.it)

Ricevuto: 29/07/2020 - Accettato: 25/08/2020

lutazione generale, volta ad identificare eventuali patologie concomitanti o la presenza di metastasi. Infine, ma non di minore importanza, il livello di *compliance* del proprietario incide notevolmente sulla scelta terapeutica. L'obiettivo di questa *review* è quello di descrivere le principali terapie mediche disponibili per il trattamento del-

La terapia dell'ipercortisolismo spontaneo, PDH o ADH, può essere medica o chirurgica. Quest'ultima, ad oggi, è l'unica in grado di eliminare la causa della patologia.

l'HC ipofisario e surrenalico suddividendole in base all'organo d'azione target (ipofisi VS ghiandole surrenali). Inoltre, verranno approfonditi i possibili metodi di monitoraggio del trattamento con trilostano, il quale, ad oggi, rappresenta la terapia medica d'elezione per la SC nel cane.

TRATTAMENTO MEDICO CON TARGET LE GHIANDOLE SURRENALI

In passato sono stati studiati ed utilizzati numerosi principi attivi con l'obiettivo di trattare l'HC. Fino a 30 anni fa il mitotano (*o,p'*-DDD) era il farmaco maggiormente utilizzato mentre, ad oggi, il trilostano è considerato il trattamento medico d'elezione per i cani con HC. Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi riguardo possibili alternative terapeutiche, molti dei quali hanno mostrato dei risultati promettenti.

Trilostano

Il trilostano è uno steroide sintetico che inibisce in modo competitivo l'enzima 3β -idrossisteroide deidrogenasi (3β HSD), il quale è necessario per la sintesi di tutti gli ormoni surrenalici e in particolare del cortisolo (Figura 1).¹ Inibendo la produzione di cortisolo, si riduce/viene a mancare il *feedback* negativo a livello ipofisario con conseguente aumento compensatorio dell'ACTH plasmatico.² Il trilostano è registrato per il trattamento sia del PDH che dell'ADH, ma la maggior parte degli studi sull'utilizzo di tale farmaco sono stati eseguiti su cani con PDH.³ Il trilostano viene assorbito rapidamente dal tratto gastroenterico, in particolare quando assunto con l'alimento, pertanto viene sempre consigliata la somministrazione contestualmente al pasto.⁴ A differenza di quanto consigliato circa 10-15 anni fa, il dosaggio di partenza che oggi viene utilizzato è molto più basso, anche se esiste una marcata variabilità sul dosaggio di partenza tra i vari studi presenti in letteratura.⁵ Con il passare degli anni si è arrivati alla conclusione che tramite l'utilizzo di dosaggi inferiori si riescono ad ottenere dei risultati terapeutici migliori, riducendo al contempo il ri-

schio di comparsa di effetti collaterali.⁶⁻⁸ Cani di taglia grande o gigante generalmente richiedono un dosaggio inferiore per kg di peso corporeo rispetto a cani di taglia piccola (< 15 kg).⁷ Poiché la durata della soppressione della produzione di cortisolo è inferiore a 12 ore nella maggior parte dei cani, la somministrazione di trilostano due volte al giorno (BID) può migliorare la risposta clinica del paziente.⁶ Quando si usa un protocollo basato su due somministrazioni giornaliere è consigliata una dose iniziale di 0,5-1 mg/kg ogni 12 ore con una massima dose di partenza pari a 30 mg/cane BID, per cani di peso > 30 kg. In questo modo, in molti pazienti, è possibile ottenere il completo controllo dei segni clinici e una cortisolemia ottimale usando dosaggi bassi di trilostano, riducendo significativamente gli effetti collaterali.^{6,9-12,14} La terapia in singola dose giornaliera risulta comunque un'alternativa valida e in questo caso il dosaggio di partenza

Il trilostano è oggi il farmaco d'elezione per la terapia medica dell'HC. I dosaggi consigliati sono più bassi rispetto al passato e pari a 0,5-1 mg/kg BID.

dovrebbe essere di 1-2 mg/kg una volta al giorno.³ Dopo l'inizio della terapia, un'adeguata dose di trilostano porta a miglioramenti clinici evidenti, quali: miglioramento/risoluzione di astenia e letargia, riduzione di poliuria, polidipsia e polifagia. È necessario un periodo di tempo maggiore (anche mesi) per osservare dei miglioramenti a livello di cute e pelo, in particolare se vi è la presenza di *calcinosis cutis*. Le condizioni del mantello possono inizialmente peggiorare a causa della muta dei peli in fase telogena e della perdita di scaglie di pelle secca.¹⁴ Il trilostano è normalmente ben tollerato, soprattutto se viene utilizzato a bassi dosaggi; la percentuale di effetti avversi è riportata tra il 13% in caso di somministrazione SID e il 19% qualora venga somministrato BID.^{8,11,15,16} Il principale effetto avverso riguarda l'ipocortisolismo transiente (carenza di glucocorticoidi), che di solito si associa a letargia, debolezza, disoressia, vomito e diarrea.¹⁴ Nei casi più gravi si può incorrere in una ipofunzionalità surrenalica completa (con carenza sia di glucocorticoidi sia di mineralcorticoidi). Un recente studio ha riportato che in un cane in terapia con trilostano, la possibilità di sviluppare un episodio clinico di ipocortisolismo nei primi due anni di trattamento è approssimativamente del 15%.¹² Nella maggioranza dei casi, gli effetti collaterali si esauriscono una volta interrotta la terapia farmacologica; in questi pazienti è consigliabile riprendere il trattamento con trilostano ad un dosaggio inferiore nel momento in cui si ripresentino i segni clinici di HC. In alcuni cani l'ipoadrenocorticismo iatrogeno può risultare permanente; ciò potrebbe essere dovuto alla ne-

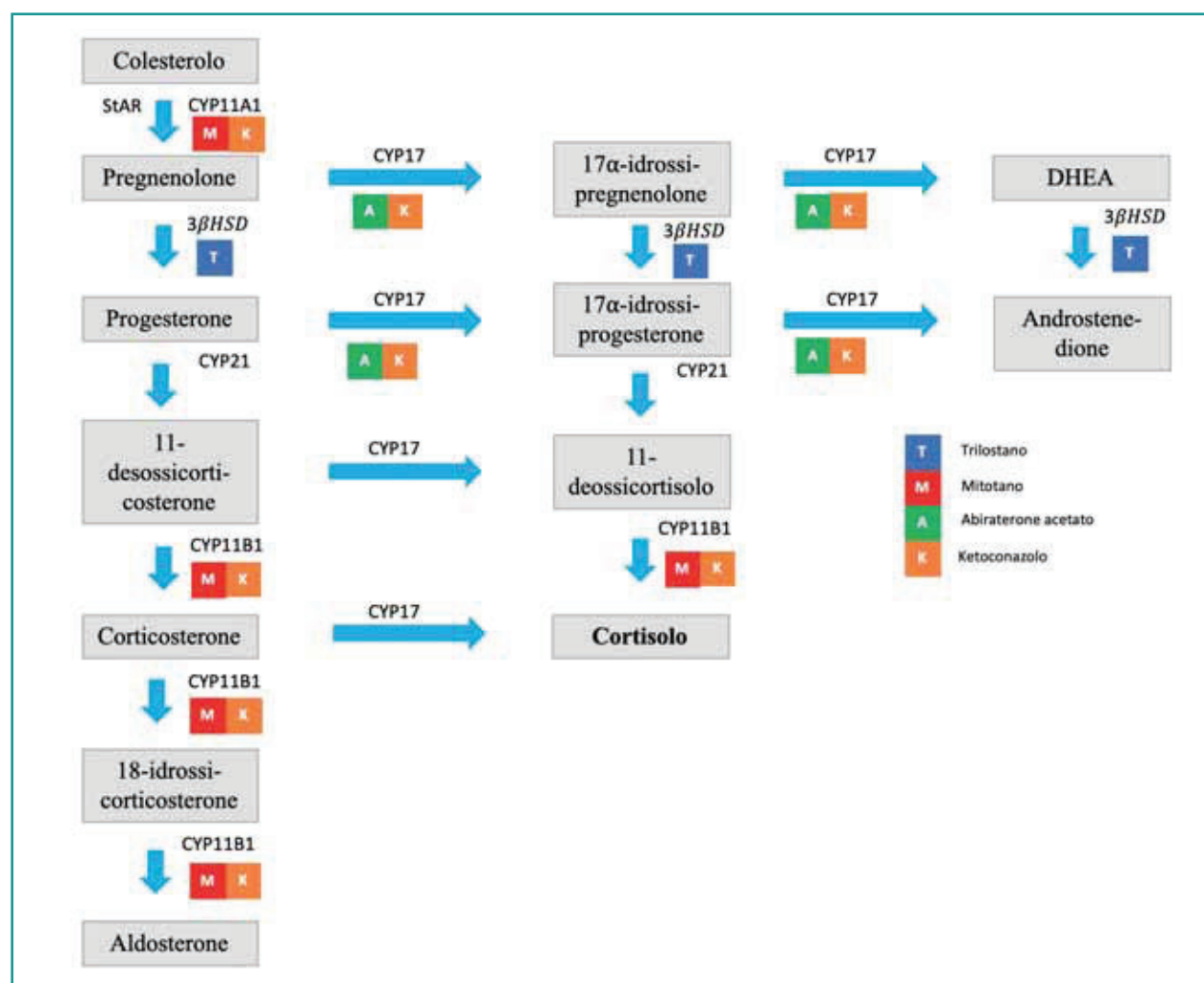


Figura 1 - Rappresentazione schematica della steroidogenesi e azione dei vari farmaci con target surrenalico. StAR, *steroidogenic acute regulatory protein*; CYP11A1, *cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme*; 3 β HSD, *3 β -hydroxysteroid dehydrogenase*; CYP17, *17 α -hydroxylase/17,20-lyase*; CYP21, *21-hydroxylase*; CYP11B1, *11 β -hydroxylase*. Modificato da: Sanders K, Kooistra HS, Galac S. Treating canine Cushing's syndrome: Current options and future prospects. *The Veterinary Journal*, 241, 42-51, 2018.

croci delle surrenali che può risultare talvolta fatale.^{12,17,18} Uno studio che ha valutato post-mortem le ghiandole surrenali ha dimostrato che in quattro dei sei cani con PDH, trattati con trilostano, era presente necrosi surrenalica¹⁹. Studi successivi hanno evidenziato come la causa della necrosi surrenalica non sembri essere data da un'azione diretta da parte del trilostano, bensì dall'aumento della produzione di ACTH, dovuta alla perdita del *feedback* negativo cortisolo-indotto.^{20,21} Poiché il trilostano può determinare anche una soppressione della produzione di aldosterone, seppur in minor misura rispetto a quella di cortisolo, i cani in terapia possono sviluppare un ipoaldosteronismo iatrogeno. Per questo motivo è opportuno porre attenzione alla somministrazione contemporanea di trilostano e ACE inibitori o antagonisti dell'aldosterone per evitare un effetto cumulativo sulla soppressione della concentrazione di aldosterone. L'aspettativa di vita mediana dei cani con PDH che ricevono trilostano va-

Gli effetti collaterali legati al trilostano si verificano nel 15% dei casi con un ipocortisolismo transitorio. In corso di terapia si può assistere a un aumento delle dimensioni dell'adenoma ipofisario.

ria dai 662 giorni agli 852 giorni nei diversi studi e la sopravvivenza media riportata è di circa 30 mesi.²²⁻²⁴ Nei cani con PDH il trilostano riduce e controlla i segni clinici dovuti all'eccesso di glucocorticoidi nel 90% dei soggetti, ma non agisce sulla crescita della neoplasia ipofisaria; questo è, inizialmente, irrilevante nei pazienti che non presentano un aumento di volume della ghiandola ipofisi, ovvero nei cani con microadenoma.²⁵ In uno studio effettuato su cani sani sottoposti a trattamento con trilostano è stato verificato un incremento significativo della ghiandola pituitaria; tuttavia, ad oggi, non sono presenti in letteratura dati che riportino lo stesso effetto su soggetti affetti da PDH.²⁶ Ciò nonostante, specialmen-

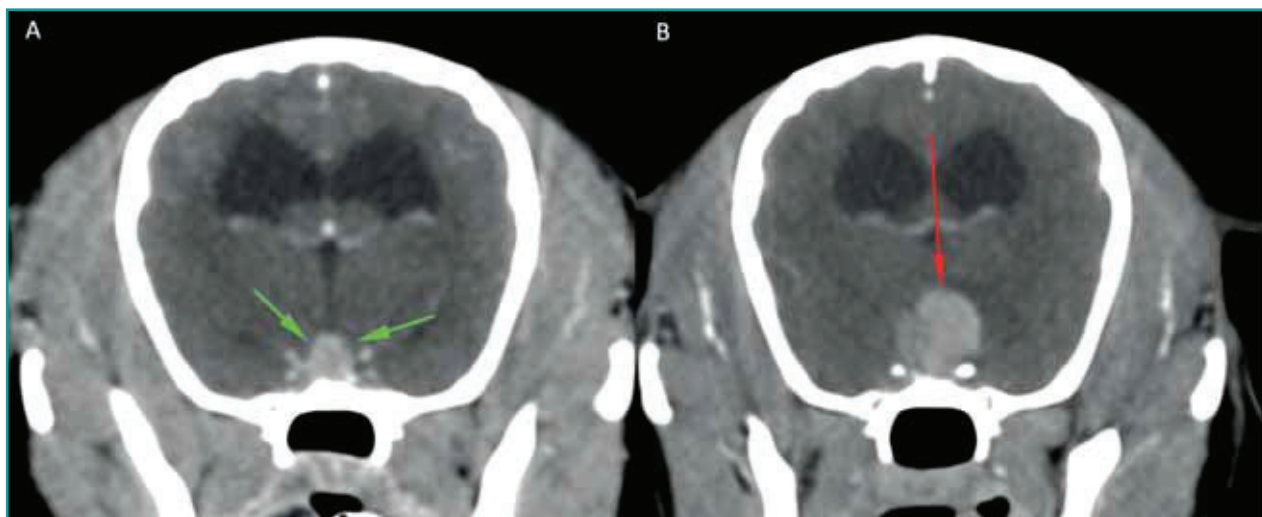


Figura 2 - Sezioni trasversali post-contrasto del cranio a carico della fossa ipofisaria di cane meticcio affetto da PDH. **A)** Macroadenoma ipofisario prima dell'inizio della terapia con trilostano (dimensioni 0,7 cm dv x 0,5 cm ml x 0,6 cm rostrocd). **B)** Macroadenoma ipofisario di dimensioni aumentate dopo un anno di terapia con trilostano (dimensioni 1,2 cm dv x 1,3 cm ml x 2,6 cm rostrocd).

te nei pazienti di età più giovane con HC, dovrebbe essere effettuato un controllo tramite tomografia computerizzata (TC) o risonanza magnetica (RM) dopo circa un anno di trattamento con trilostano in modo da rivalutare le dimensioni ipofisarie (Figura 2).³

Nei cani con ADH la chirurgia è la terapia d'elezione considerando che questi tumori sono prevalentemente maligni ed il trilostano non ne impedisce la crescita o la diffusione metastatica. La terapia medica è prettamente di tipo palliativo e riduce efficacemente i segni clinici, con risultati paragonabili a quelli ottenuti su cani con PDH.^{24,27-29} L'aspettativa di vita mediana dei cani con ADH trattati con trilostano varia dai 353 ai 427 giorni nei diversi studi presenti in letteratura.^{15,30} Sebbene non ci siano dati scientifici disponibili per supportare questa teoria, sembra che i cani con neoplasia surrenalica sia-

nitoraggio clinico associato a una valutazione oggettiva ottenuta tramite indagini laboratoristiche. È quindi importante, fin da subito, far comprendere al proprietario che il paziente richiederà numerosi controlli soprattutto nelle prime fasi della terapia.

Monitoraggio della terapia con trilostano

Fin dal 1998, quando il trilostano fece la sua prima comparsa in ambito veterinario, il test di stimolazione con ACTH (ACTHst) è stato il metodo di monitoraggio maggiormente consigliato e, nonostante non sia mai stato validato per questo proposito, rimane ad oggi il più utilizzato nella pratica veterinaria.²⁴ Poiché il trilostano ha una durata d'azione relativamente breve, è possibile riscontrare delle variazioni nei risultati dell'ACTHst in base al tempo intercorso dall'ultima somministrazione del farmaco.^{9,13,31} È stato dimostrato come il picco d'azione del trilostano nei cani sani venga raggiunto dopo 1,5-2 ore dall'assunzione del farmaco e diminuisca fino a raggiungere valori basali in circa 10-18 ore.³² Un recente studio ha messo in evidenza come nei cani con PDH la concentrazione sierica di cortisolo inizi a ridursi dopo circa un'ora dalla somministrazione del trilostano, raggiunga il picco dopo circa 2-3 ore e, nella maggior parte dei soggetti, non risulti soppressa per l'intera durata di 12 ore.¹³ Poiché il *nadir* del cortisolo sierico avviene tra le due e tre ore dall'assunzione del farmaco, l'ACTHst andrebbe eseguito dopo 2-3 ore dalla somministrazione.^{13,21,33,34} Alcuni autori suggeriscono di effettuare il test dalle 4 alle 6 ore post-somministrazione, ma studi precedenti dimostrano come i risultati così ottenuti possano risultare fuorvianti.^{13,24} In passato era consigliato effettuare il primo ACTHst dopo 10-14 giorni dall'inizio della tera-

I cani con ADH sembrano essere più sensibili alla terapia con trilostano. Cani con PDH o ADH trattati con trilostano devono essere strettamente monitorati soprattutto nelle prime fasi della terapia.

no particolarmente sensibili al trattamento farmacologico con trilostano, motivo per cui il dosaggio iniziale consigliato dovrebbe essere relativamente basso (0,5 mg/kg SID o BID).³

L'obiettivo della terapia con trilostano, sia nel caso di ADH che di PDH, è quello di ridurre i livelli sierici di cortisolo, portandoli a delle concentrazioni tali da permettere la risoluzione dei segni clinici senza, tuttavia, incorrere in un ipocortisolismo iatrogeno. Per raggiungere questo scopo è pertanto necessario un attento mo-

pia con trilostano. Poiché il pieno effetto del farmaco viene raggiunto dopo circa 30 giorni dall'inizio del trattamento, questo controllo veniva eseguito principalmen-

Il test di stimolazione con ACTH è il test maggiormente utilizzato per il monitoraggio della terapia con trilostano e va eseguito a 2-3 ore dalla somministrazione del farmaco.

te allo scopo di scongiurare un eventuale sovradosaggio; non era quindi consigliato eseguire modifiche di dose del trilostano sulla base del primo monitoraggio.²³ Per questo motivo e poiché oggi i dosaggi di trilostano utilizzati risultano molto inferiori rispetto a quelli passati, riducendo quindi il rischio di ipocortisolismo, il consiglio è di effettuare il primo controllo direttamente dopo 30 giorni dall'inizio della terapia. In un cane con HC in terapia con trilostano, una cortisolemia post stimolazione compresa tra 1,5 e 5,5 µg/dL (o 40-150 nmol/L) è indicativa di un buon controllo. Qualora fosse necessario modificare la dose di farmaco, l'entità dell'incremento o della riduzione dovrebbe corrispondere al 25% circa del dosaggio precedente.²⁴ Nel caso in cui il paziente riceva la terapia BID e presenti dei valori di cortisolo negli intervalli di riferimento, ma continui ad avere segni clinici, vanno presi in considerazione due possibili scenari: (1) è probabile che il paziente necessiti della somministrazione ogni 8 ore (TID)^{6,13} oppure (2) i segni clinici potrebbero essere riferibili ad un'altra patologia o alla presenza di un macroadenoma ipofisario.

A distanza di 30 giorni dalla variazione di dosaggio andrebbe effettuato un nuovo ACTHst; successivamente, quando le condizioni cliniche e la dose di trilostano si sono stabilizzate, il paziente andrebbe rivalutato ogni 60-90 giorni fino ad un intervallo che non dovrebbe superare i 3 mesi.²⁴

Per lungo tempo l'ACTHst è stato considerato il *gold standard* per il monitoraggio dei cani con HC in terapia con trilostano. Da diversi anni sono state sollevate una serie di preoccupazioni sull'affidabilità di tale test come strumento di monitoraggio a causa di vari motivi: (1) risultati strettamente dipendenti dal tempo intercorso dall'ultima somministrazione del farmaco,^{9,13,31,33,34} (2) scarsa correlazione tra la condizione clinica e la percezione del benessere del cane da parte del proprietario,^{13,35,36} (3) somministrazioni di elevate dosi di ACTH sintetico determinano necrosi surrenalica (studio effettuato su ratti),²¹ (4) test che richiede tempo, (5) elevati costi e scarsa disponibilità di ACTH sintetico. Per questo motivo nel corso degli anni sono stati valutati diversi possibili metodi di monitoraggio alternativi. In particolare, sono stati indagati parametri quali: cortisolo basale, ACTH endogeno, rapporto cor-

tisolo/ACTH, proteine di fase acuta positive (aptoglobina sierica, sieroamiloide A, proteina C reattiva), rapporto cortisolo e creatinina urinaria (UCCR) e peso specifico urinario (USG); nessuno di questi metodi sembrava tuttavia avere una maggiore affidabilità rispetto all'ACTHst.^{13,36-41} Studi recenti hanno confrontato la correlazione tra il cortisolo pre-trilostano (o *prepill*) ed il cortisolo post-ACTH con i segni clinici riportati dal proprietario, al quale veniva richiesto di rispondere ad un questionario standardizzato.^{35,42} I risultati di questi studi hanno permesso di evidenziare una migliore correlazione del *prepill* con lo score clinico. Una successiva indagine ha mostrato che il valore di cortisolo *prepill*, in cani che assumono un dosaggio di trilostano costante, è il parametro maggiormente ripetibile rispetto ai valori di cortisolo a pre e post-ACTH.⁴² La misurazione di una singola concentrazione sierica di cortisolo immediatamente prima dell'assunzione di trilostano sembrerebbe portare quindi ad una valutazione più affidabile del controllo terapeutico. Tuttavia, nessuno dei tre valori di cortisolo (*prepill*, pre e post-ACTH), se analizzati singolarmente, ha mostrato una correlazione così forte con lo score clinico da poter essere

Il test di stimolazione con ACTH presenta numerosi limiti ed è stato, in parte, sostituito negli ultimi anni con la misurazione del cortisolo prima della somministrazione di trilostano (*prepill*).

utilizzato come unico test per il monitoraggio della terapia.³⁵ Inoltre, la concentrazione di cortisolo sierico fluttua durante l'arco della giornata ed è influenzata da vari fattori, tra cui lo stress.⁴³ Boretti e colleghi (2018)⁴⁴ hanno messo a confronto due misurazioni di cortisolo *prepill*, effettuate a distanza di un'ora l'una dall'altra, in cani con HC durante la terapia con trilostano. La concordanza tra le due misurazioni è risultata essere solo parziale, poiché in circa il 30% dei pazienti i due valori di cortisolo differivano in maniera significativa, influenzando quindi la decisione terapeutica. I cani con valori di cortisolo *prepill* al di sotto del *range* di riferimento (1,5-5 µg/dL o 40-140 nmol/L) sono i più critici, poiché si rende necessario escludere il sovradosaggio di trilostano e quindi l'evenienza di un ipocortisolismo iatrogeno. Alcuni studi hanno riportato che cani con bassi livelli di cortisolo dopo qualche ora dalla somministrazione di trilostano (ovvero intorno al momento di massima azione del farmaco) con buona probabilità non svilupperanno segni clinici di ipocortisolismo.^{31,35} Al contrario, una bassa concentrazione di cortisolo *prepill* potrebbe indicare in modo più affidabile un'eccessiva soppressione, poiché questa viene misurata dopo circa 12 ore (o 24 ore se il farmaco viene somministrato SID) dall'ultima somministrazione di

trilostano, quando ormai l'effetto del farmaco è minimo.³⁵ Dagli studi effettuati fino ad ora non emergono tuttavia sufficienti informazioni riguardo la capacità di questo test nell'identificare i pazienti sovradosati e l'ACTHst resta ancora il *gold standard* per la diagnosi di ipocortisolismo indotto da trilostano. **In un cane con HC in terapia con trilostano, una cortisolemia *prepill* compresa tra 1,5 e 5 µg/dL (o 40-140 nmol/L) è indicativa di un buon controllo.** Le indicazioni riguardo quando incrementare o diminuire la dose di trilostano e l'intervallo di tempo che deve intercorrere tra un controllo e l'altro restano gli stessi identificati con l'ACTHst. I limiti della misurazione del cortisolo *prepill* sono: 1) l'influenza da parte dello stress in soggetti particolarmente agitati o aggressivi, 2) la mancata conoscenza riguardo le capacità di questo test nell'identificare i soggetti che ricevono dosi eccessive di trilostano. Recentemente è stato pubblicato un nuovo studio da Bermejo e colleghi¹³ che ha valutato diversi metodi di monitoraggio in una popolazione di cani con PDH riportandoli all'andamento clinico estrapolato dall'opinione del proprietario. I metodi di monitoraggio presi in considerazione includevano: l'ACTHst, il *prepill* ottenuto in due misurazioni a distanza di 30 minuti, il rapporto cortisolo/creatinina urinari (UCCR), il peso specifico delle urine e la misurazione seriale della concentrazione di cortisolo nelle 12 ore successive alla somministrazione del trilostano. Nello studio nessuno dei parametri sopracitati è risultato essere in grado di discriminare tra cani con un buon controllo e cani con uno scarso controllo della patologia. Gli autori concludono lo studio affermando come

ad oggi non esiste un metodo di monitoraggio su cui fare affidamento in modo totale e come la percezione dell'andamento della patologia da parte del proprietario ri-

Nel caso di un sospetto di sovradosaggio il test di stimolazione con ACTH resta il *gold standard*. Nessun test ad oggi è in grado di sostituirsi alla valutazione clinica.

sulti ciò su cui basare la decisione finale riguardo eventuali modifiche della dose. Aggiungono, inoltre, come potenzialmente il peso specifico delle urine possa essere considerato un possibile metodo di monitoraggio specifico ma non sensibile nell'identificare un buon controllo, risultando semplice, veloce ed economico. Sulla base dei dati presenti in letteratura, ad oggi, la risposta clinica alla terapia può essere considerata il miglior metodo di monitoraggio del trattamento con trilostano dell'HC. L'ACTHst resta il *gold standard* per la diagnosi di ipocortisolismo iatrogeno e quindi deve essere effettuato in tutti i quei casi in cui si sospetti, sulla base dei segni clinici (es. disappetenza/anoressia, vomito, diarrea), un sovradosaggio del farmaco. In tutti quei pazienti in cui non vi sia un sospetto di ipocortisolismo iatrogeno l'esecuzione del cortisolo *prepill* associato alla misurazione del peso specifico urinario sono i metodi di monitoraggio più pratici, veloci ed economici per la valutazione di eventuali modifiche della dose di trilostano. Tuttavia, qualsiasi decisione riguardo il dosaggio del farmaco deve essere presa basandosi in *primis* sulla clinica del paziente e sulla percezione

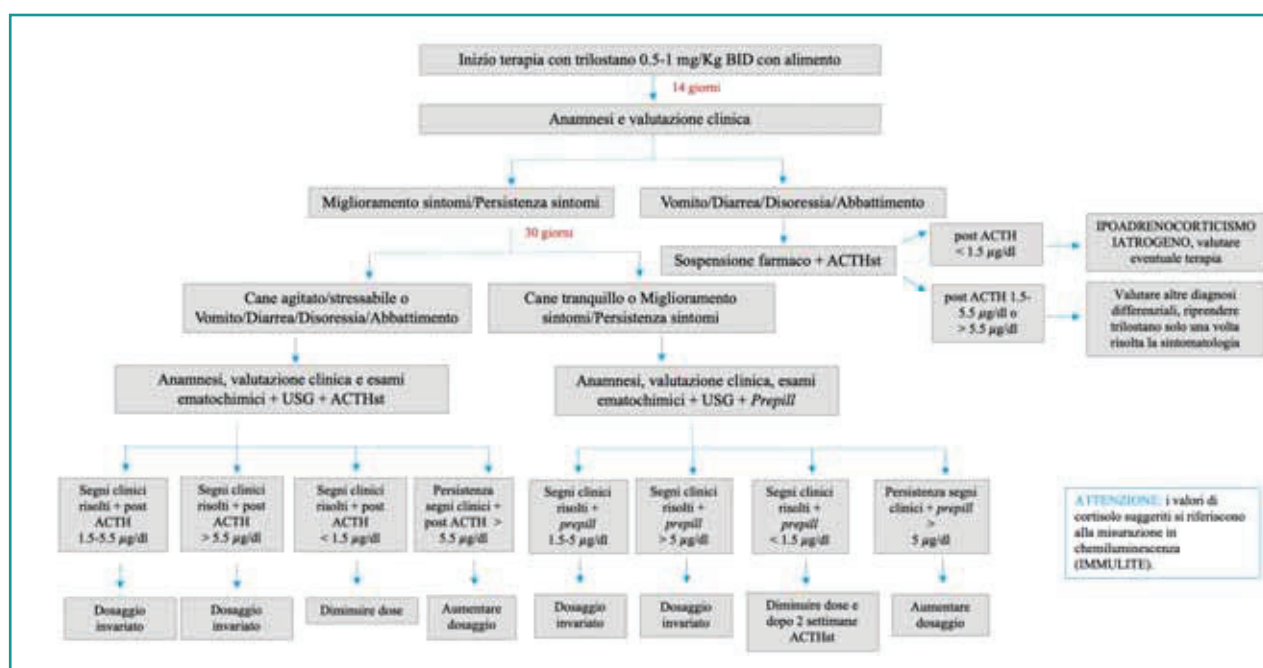


Figura 3 - Protocollo di utilizzo e monitoraggio della terapia con trilostano in cani con ipercortisolismo spontaneo. USG, *urinary specific gravity*, peso specifico urinario; ACTHst, *ACTH stimulation test*, test di stimolazione con ACTH; post ACTH, cortisolo post stimolazione con ACTH; *prepill*, cortisolo prima della somministrazione di trilostano.

dell'andamento della patologia da parte del proprietario dell'animale. La Figura 3 mostra il protocollo di utilizzo e monitoraggio della terapia con trilostano in cani affetti da HC.

Mitotano

Il mitotano (o,p'-DDD) è un agente adrenocorticolitico che porta alla necrosi selettiva della zona fascicolata e reticolare, aree della corteccia surrenalica che secernono cortisolo e ormoni sessuali. Nonostante la zona glomerulosa sia relativamente resistente all'effetto del mitotano, la produzione di aldosterone può essere compromessa nel caso in cui siano utilizzati elevati dosaggi. In aggiunta, questo principio attivo inibisce alcuni degli enzimi della steroidogenesi quali l'enzima di clivaggio della catena laterale del colesterolo citocromo P450 (CYP11A1) e l'enzima CYP11B1, inibendo a sua volta la sintesi di cortisolo,^{45,46} mentre induce il citocromo P450 enzima 3A4 (CYP3A4), il quale determina un'aumentata *clearance* metabolica dei glucocorticoidi.⁴⁷

Recentemente è stato dimostrato come una delle conseguenze dell'utilizzo di mitotano sia l'inibizione della sterolo-O-aciltransferasi 1 (SOAT1), un enzima che catalizza la conversione del colesterolo libero in estere determinandone un aumento a livello di cellule con conseguente apoptosi cellulare. Il grado di risposta alla terapia con mitotano potrebbe essere correlato all'espressione di tale enzima. Infatti, lo studio di Sbiera *et al.*, (2015) ha evidenziato come i pazienti umani con un'elevata concentrazione di SOAT1 rispondessero

meglio al mitotano rispetto ai pazienti con una bassa espressione dello stesso enzima.⁴⁸

Attualmente il mitotano è stato largamente sostituito dall'utilizzo del trilostano per trattare la SC nel cane, ciò è avvenuto principalmente per la maggior sicurezza nella gestione del paziente ed i minori effetti avversi associati ad un'efficacia paragonabile.^{4,41,49}

Per il mitotano sono disponibili due tipi di protocolli terapeutici: il protocollo standard o selettivo (Figura 4) e il protocollo non selettivo. Il primo mira alla distruzione selettiva della zona fascicolata e reticolare, risparmiando la zona glomerulosa e quindi la produzione di mineralcorticoidi. Il protocollo non selettivo induce invece la necrosi dell'intera corteccia surrenalica determinando un ipoadrenocorticismi iatrogeno; con questo secondo pro-

Il mitotano è stato ormai sostituito dal trilostano che risulta più maneggevole e sicuro. Resta un'opzione in quei casi che sembrano resistenti alla terapia con trilostano.

collo il cane viene successivamente gestito come se si trattasse di un soggetto affetto da Morbo di Addison. Le differenze tra i due approcci terapeutici consistono in una diversa dose di farmaco e in una differente durata del periodo di induzione. In caso di ADH, il trattamento con mitotano rappresenta ancora oggi una buona opzione poiché esso ha il vantaggio di poter distruggere le cellule surrenaliche tumorali, oltre a ridurre la produzione di cortisolo. In questi casi è possibile applicare il protocollo non-

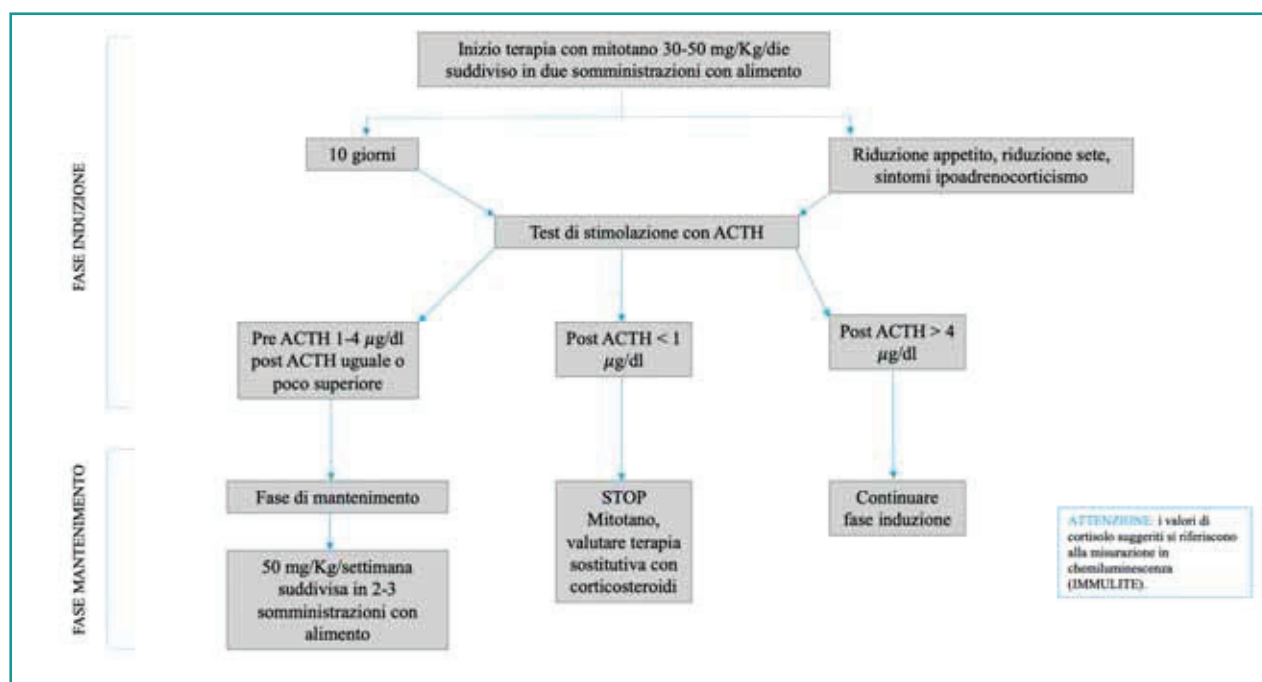


Figura 4 - Schema di utilizzo e monitoraggio del protocollo selettivo con mitotano. *Pre ACTH*, cortisolo prima della somministrazione di ACTH; *post ACTH*, cortisolo dopo un'ora dalla stimolazione con ACTH.

selettivo con lo scopo di colpire l'intera corteccia surrenalica.^{41,50}

Gli effetti avversi provocati dall'utilizzo di mitotano includono anoressia, letargia, debolezza e diarrea,⁵⁰ in questi casi si rende necessario interrompere la terapia allo scopo di evitare una crisi ipoadrenocorticoide potenzialmente fatale. La probabilità del paziente di sviluppare tale complicazione aumenta se non viene effettuata la terapia sostitutiva con glucocorticoidi.

A causa della citotossicità del mitotano è consigliabile non utilizzarlo nell'eventualità in cui ci siano donne gravide o bambini in ambiente domestico.⁴¹

Per valutare la risposta alla terapia con mitotano e monitorarne l'andamento il test di stimolazione con ACTH viene considerato il *gold standard*. In aggiunta al test endocrino è importante valutare la concentrazione ematica di sodio e potassio così da poter regolare il dosaggio di mineralcorticoidi somministrati in base alle esigenze di ogni singolo paziente.⁴¹

L'aspettativa di vita mediana dei cani con ADH trattati con mitotano varia da 102 a 476 giorni e non differisce significativamente dalla sopravvivenza mediana dei cani trattati con trilostano.^{30,15} Tuttavia, in questi studi non è stato effettuato il protocollo non-selettivo volto a determinare la completa necrosi surrenalica e questo potrebbe avere influenzato le conclusioni.

La terapia con mitotano deve essere presa in considerazione per quei soggetti che non mostrino alcun miglioramento della sintomatologia clinica nonostante l'aumento progressivo della dose di trilostano.

Ketoconazolo

Il ketoconazolo è un sintetico imidazolico originariamente prodotto come agente antifungino. Ad elevati dosaggi, tuttavia, è in grado di inibire molteplici enzimi citocromo P450, tra cui il CYP11A1, il CYP17 ed il CYP11B1,⁵¹ riducendo la sintesi di cortisolo; minimo è l'effetto sulla produzione di mineralcorticoidi. In passato, il ketoconazolo è stato utilizzato per trattare i soggetti con HC, ma la percentuale di risposta era relativamente bassa (approssimativamente del 75%) e provocava maggiori effetti indesiderati rispetto al trilostano.^{29,53} Molti cani richiedono dosaggi elevati del farmaco per lunghi periodi di tempo prima di ottenere la remissione dei segni clinici; per questo motivo non è infrequente lo sviluppo di effetti collaterali quali vomito, diarrea, anoressia e ittero. In conclusione, il ketoconazolo come terapia per l'HC viene utilizzato raramente a causa del costo elevato, della bassa efficacia terapeutica e degli effetti collaterali.⁵⁴ In medicina umana, il levoketoconazolo, enantiomero del ketoconazolo purificato dalla forma racemica, è risultato essere un migliore inibitore della produzione di cortisolo associato a ridotta epatotossicità, sia in vitro che

in vivo, ma è tutt'oggi oggetto di studio.^{54,55}

NUOVE POSSIBILITÀ TERAPEUTICHE CON TARGET SURRENALICO

I principali aspetti negativi delle terapie mediche che agiscono a livello surrenalico includono: la bassa selettività per la cascata dei glucocorticoidi, la possibilità di sovradosaggio e in alcuni casi il rischio di incorrere in un ipocortisolismo iatrogeno permanente. In questa sezione vengono presi in considerazione alcuni nuovi farmaci con una migliore selettività, efficacia e tollerabilità se comparati con le odierne opzioni terapeutiche. Questi farmaci sono ad oggi poco utilizzati in ambito veterinario a causa della carenza di studi clinici che ne abbiano valutato l'efficacia e la sicurezza nel cane; in futuro, tuttavia, potrebbero rappresentare un'opzione terapeutica sia per la forma ipofisaria che surrenalica.

Attualmente sono oggetto di studio numerosi farmaci con una migliore selettività, efficacia e tollerabilità che agiscono direttamente a livello surrenalico.

Antagonisti del recettore 2 della melanocortina

Il recettore 2 per la melanocortina (MC2R) è un recettore altamente selettivo per l'ACTH e viene espresso solamente a livello di corteccia della ghiandola surrenalica;⁵⁶ un antagonista selettivo del MC2R potrebbe pertanto avere un grande potenziale nel trattamento farmacologico del PDH, in quanto potrebbe impedire direttamente l'eccessiva stimolazione ormonale senza avere altri effetti sul surrene. La selettività di tale antagonista per gli MC2R è cruciale, poiché se inavvertitamente si dovesse antagonizzare qualsiasi altro recettore della melanocortina si potrebbero sviluppare molteplici effetti avversi.^{57,58} Un recente studio ha valutato la capacità di due composti peptidici, il BIM-22776 (#776) e il BIM-22A299 (#299), nell'antagonizzare selettivamente i MC2R su colture cellulari surrenaliche ottenute da 8 cani sani. Gli autori hanno evidenziato come entrambi i composti, in particolare il #299, siano degli antagonisti efficaci dei recettori MC2 in vitro.⁵⁹

Abiraterone acetato

Recentemente, nel cane, è stato evidenziato come la 17 β -idrossilasi/17,20-liasi (CYP17) sia l'unico enzima steroidogenico necessario per la produzione di cortisolo ma non di aldosterone;⁶⁰ per questo motivo l'inibizione selettiva del CYP17 potrebbe rappresentare un interessante approccio terapeutico in corso di HC poiché non si andrebbe ad interferire con la produzione dei mineral-

corticoidi. L'abiraterone acetato è uno di questi inibitori e uno studio ne ha valutato l'efficacia nell'inibire la produzione di cortisolo da parte delle surrenali. In particolare, è stata valutata l'azione dell'abiraterone sulla produzione ormonale surrenalica in colture cellulari surrenaliche ottenute da 9 cani sani. Lo studio ha messo in evidenza come l'abiraterone sia risultato in grado di bloccare la produzione di cortisolo e non degli altri ormoni surrenalici.⁶¹

Agonisti inversi del fattore-1 steroidogenico

Il fattore-1 steroidogenico (SF-1) è un recettore nucleare che regola lo sviluppo e la crescita delle cellule surrenaliche e la steroidogenesi.⁶² L'ACTH stimola l'attività trascrizionale di SF-1, il quale a sua volta aumenta la trascrizione di geni che codificano per gli enzimi steroidogenici.⁶³ Un aumento dell'attività del SF-1 è perciò un'importante caratteristica dei cani con PDH; inoltre, è stata riscontrata una maggiore espressione di SF-1 nei tumori surrenalici cortisolo secernenti. È interessante notare come in uno studio recente, effettuato in vitro, sia stato dimostrato come un composto agonista inverso del SF-1 agisca sia come inibitore della sintesi di cortisolo sia sull'espressione genetica delle cellule adrenocorticotrope canine.⁶⁴

A differenza dell'uomo, l'ipofisi del cane esprime maggiormente i recettori della somatostatina SSTR2; tuttavia, attualmente non esistono farmaci registrati nel cane che vadano ad agire direttamente a livello ipofisario.

Inibitori della sterolo-O-aciltransferasi 1

Come menzionato precedentemente, è stato scoperto di recente che il mitotano è in grado di inibire l'enzima SOAT1 con conseguente aumento della concentrazione citoplasmatica di colesterolo libero e citotossicità. Degli inibitori della SOAT1, che abbiano la stessa azione adrenocorticotropica del mitotano, ma con meno effetti avversi, potrebbero essere utilizzati per trattare cani con una neoplasia surrenalica non approcciabile chirurgicamente o con presenza di metastasi. Nei primi anni '90, alcune ricerche hanno descritto come l'ATR-101, un inibitore della SOAT1, induca una potente e selettiva adrenocorticolisi in cani sani di razza Beagle.⁶⁵ Recentemente l'ATR-101 ha riacquisito interesse ed è attualmente in fase di studio come possibile trattamento medico per le neoplasie surrenaliche nell'uomo.⁶⁶⁻⁶⁸ L'effetto dell'ATR-101 è particolarmente evidente nella specie canina ed è stato messo in evidenza come la somministrazione per via orale di questo farmaco abbia permesso, in nove cani dei

dieci trattati, di diminuire la concentrazione sierica di cortisolo post ACTH. Inoltre, la diminuzione del cortisolo post ACTH è risultata essere associata a un netto miglioramento dei segni clinici degli animali riportati dal proprietario.^{69,70}

TRATTAMENTO MEDICO CON TARGET L'IPOFISI

Il trattamento dei cani con PDH, idealmente, dovrebbe avere come target il tumore ipofisario. Poiché la dopamina (DA) e la somatostatina (SST) hanno entrambe un effetto inibitorio sulle funzioni della ghiandola pituitaria, il principale obiettivo della ricerca è quello di individuare possibili terapie mediche che abbiano affinità per i loro recettori; in particolare, DRD2 (sottotipo 2 del recettore per la DA), SSTR2 e SSTR5 (rispettivamente sottotipo 2 e sottotipo 5 del recettore per la SST). Negli adenomi del cane, quello maggiormente espresso è il SSTR2, mentre il DRD2 e in particolare il SSTR5 sono espressi in maniera nettamente inferiore. Quando si mettono a confronto le possibilità terapeutiche tra la specie umana e quella canina, è importante tener conto che la distribuzione di questi recettori è differente; infatti, nell'uomo si ha una maggiore espressione dei SSTR5 e DRD2.⁷¹ Attualmente non esistono farmaci registrati ad uso veterinario che abbiano come bersaglio la ghiandola ipofisi per l'utilizzo nei cani con PDH. Sono tuttavia in corso numerosi studi per individuare la molecola farmacologica più efficace e sicura per il trattamento del PDH nel cane.

Cabergolina

La cabergolina è un agonista dopaminergico che si lega ai DRD2. Poiché negli adenomi ipofisari del cane l'espressione di questi recettori è modesta, le cellule tumorali in vitro rispondono solo moderatamente all'utilizzo di cabergolina.⁷¹ Uno studio condotto in vivo ha tuttavia mostrato come il 43% dei cani con PDH presenti una buona risposta al trattamento con cabergolina, con miglioramento dei segni clinici, riduzione delle dimensioni della neoplasia ed abbassamento rapporto cortisolo e creatinina urinari (UCCR).⁷² Questa discrepanza tra i due studi potrebbe essere spiegata da una diversa durata del periodo di trattamento.⁷¹

Pasireotide

Il pasireotide (SOM230) è un analogo della somatostatina che si lega ai recettori di tipo 1, 2, 3 e 5.⁷³ In uno studio effettuato su venti cani con PDH, la somministrazione di pasireotide ha determinato la riduzione della concentrazione plasmatica di ACTH endogeno ed ha migliorato la condizione clinica dei pazienti, mentre non sono stati osservati gravi effetti avversi.⁷⁴ In una ricerca più recente, tale farmaco è stato valutato in nove cani con ma-

croadenoma ipofisario in corso di trattamento con trilostano o mitotano. Le dimensioni della ghiandola pituitaria si sono ridotte in sei pazienti su nove, mentre sono aumentate nei restanti tre cani; nonostante ciò non sono stati riscontrati segni clinici neurologici o gravi effetti avversi.⁷⁵ In medicina umana, l'efficacia del pasireotide è stata dimostrata ed il farmaco è stato approvato sia in Europa sia negli Stati Uniti come terapia alternativa per i pazienti con PDH che non possono essere sottoposti a chirurgia o in caso quest'ultima non sia stata risolutiva.^{76,77} A causa dell'espressione recettoriale del cane, un analogo della somatostatina con una più elevata affinità per il recettore SST2 rispetto al pasireotide, potrebbe essere maggiormente efficace, come viene dimostrato da esperimenti in vitro.⁷¹

Cabergolina, pasireotide, octreotide sono tutti farmaci che hanno come target l'ipofisi che sono ad oggi oggetto di numerosi studi come possibili terapie dell'ipercortisolismo spontaneo canino.

Octreotide

L'octreotide è un analogo della SST che presenta un'elevata affinità recettoriale per i SSTR2, mentre ha una moderata affinità per i SSTR3 ed i SSTR5.⁷⁸ Nelle cellule ipofisarie adenomatoze canine in vitro, le quali presentano un'elevata espressione dei SSTR2, l'octreotide inibisce la secrezione di ACTH in maniera significativa, risultando essere migliore sia del pasireotide sia della cabergolina.⁷¹ Nell'uomo l'octreotide può provocare effetti avversi gastrointestinali, ma questi sono poco documentati nel cane. In medicina veterinaria l'octreotide può essere utilizzato come terapia nell'insulinoma del cane, per ridurre la secrezione di insulina. La sua breve durata d'azione a seguito della somministrazione sottocutanea ne limita tuttavia l'utilizzo.^{79,80} In medicina umana sono state recentemente sviluppate nuove tecnologie che permettono un aumento dell'assorbimento intestinale dei farmaci, grazie alla momentanea apertura delle *tight junctions* epiteliali; in tal modo si potrebbero raggiungere concentrazioni terapeutiche di octreotide a seguito dell'assunzione orale. Un vantaggio della somministrazione orale di octreotide potrebbe essere quello di ridurre gli effetti collaterali dovuti all'iniezione sottocutanea, ma sarebbe essenziale l'assunzione del farmaco a digiuno e due volte al giorno.⁸¹ Per i tumori ipofisari del cane, avendo un'elevata espressione dei recettori SST2, la possibilità di somministrare l'octreotide per via orale potrebbe costituire un interessante approccio terapeutico.

Chimere della dopamina e della somatostatina

Nell'uomo, sebbene sia stata provata l'efficacia degli analoghi della DA e della SST per il trattamento degli adenomi ipofisari, una percentuale considerevole di pazienti risponde scarsamente o non risponde affatto a queste terapie. Un nuovo approccio interessante, in corso di sviluppo, riguarda l'uso di chimere della DA/SST che siano grado di interagire con entrambi i tipi di recettori e, di conseguenza, possano determinare una migliore risposta terapeutica. Sono attualmente in corso alcune ricerche per valutare l'utilizzo di questi farmaci chimera nel cane.

Acido retinoico

La proopiomelanocortina (POMC) rappresenta la molecola precursore dell'ACTH e la sua espressione genica è regolata da diversi fattori di trascrizione (AP-1 e Nur77). L'acido retinoico (RA) è un agente che regola molti processi cellulari, tra cui ha il compito di ridurre il legame di questi fattori di trascrizione al loro sito di legame sul DNA, impedendo in definitiva la secrezione di ACTH. In uno studio effettuato su 22 cani con PDH sottoposti a trattamento con acido retinoico, i ricercatori hanno notato una riduzione della concentrazione plasmatica di ACTH, una diminuzione dell'UCCR, la risoluzione dei segni clinici e la riduzione delle dimensioni ipofisarie.⁸² Nell'uomo sono stati rilevati numerosi effetti avversi a seguito della somministrazione di tale farmaco, tra cui tossicità mucocutanea, insufficienza epatica, effetti teratogeni ed una grave fotosensibilità, la quale può essere ridotta limitando l'esposizione alla luce.⁵⁵ Recentemente uno studio ha mostrato come un isomero attivo dell'acido retinoico, il 9-cis RA, sia in grado di attivare il promotore del recettore dopaminergico DRD2, in modo da sensibilizzare le neoplasie pituitarie ai trattamenti con molecole dopaminergiche.⁸² In aggiunta, un analogo sintetico del RA chiamato bexarotene ha determinato l'insorgenza di ipopituitarismo in pazienti umani per cui è stato avviato un trial clinico per valutare le

Attualmente la terapia con trilostano è la terapia medica d'elezione e quella maggiormente utilizzata in corso di PDH. La valutazione clinica resta, tuttavia, il gold standard nel monitoraggio della terapia.

sue capacità terapeutiche.^{83,84}

CONCLUSIONI

La differenziazione tra PDH e ADH è essenziale nella scelta della strategia di trattamento ottimale. La rimozione chirurgica del tumore rappresenta, in entrambi i casi, una buona opzione terapeutica. Tuttavia, tali interventi, in par-

ticolare l'ipofisectomia, vengono eseguiti in pochi centri specializzati, non risultano privi di rischi e non sono adatti a tutti i pazienti.

Pertanto, viene spesso utilizzata la terapia medica con trilostano. Il monitoraggio della terapia con trilostano deve

basarsi sulla valutazione della condizione clinica del paziente, nonché sulla determinazione dei livelli sierici di cortisolo *prepill* o post-ACTH. Nuovi interessanti farmaci sono attualmente in fase di sviluppo e in futuro potrebbero rappresentare un'opzione terapeutica valida per il trattamento dell'HC.

PUNTI CHIAVE

- La terapia medica con trilostano risulta ad oggi il trattamento medico d'elezione dell'ipercortisolismo canino. Il dosaggio di partenza consigliato è più basso rispetto a quello riportato in passato e pari a 0,5-1 mg/kg BID.
- Il monitoraggio della terapia con trilostano prevede attualmente l'utilizzo del test di stimolazione con ACTH o del cortisolo *prepill*. Entrambi i metodi mostrano vantaggi e svantaggi e la valutazione clinica resta ad oggi il *gold standard*.
- Il test di stimolazione con ACTH è l'unico test in grado di identificare con precisione i soggetti sovradosati.
- Attualmente sono oggetto di studio numerosi nuovi farmaci con target surrenalico e ipofisario la cui maggiore efficacia e tollerabilità è da confermare con ulteriori studi.

Medical treatment and therapeutic monitoring options in dogs with Cushing's syndrome

Summary

The differentiation between pituitary dependent and adrenal dependent hypercortisolism is essential to determine the optimal treatment strategy. Currently trilostane is the medical therapy of choice for hypercortisolism. Trilostane allows the control of clinical signs in most of the cases without, however, leading to the resolution of the hypercortisolism. To date, trilostane treatment include two possible monitoring methods, the ACTH stimulation test and the "prepill cortisol" concentration. Both the monitoring methods has advantages and disadvantages. The aim of this review is to investigate the possible therapeutic options available to date and those still object of study for the medical treatment of canine hypercortisolism. Particular attention will be given to trilostane therapy and therapeutic monitoring.

BIBLIOGRAFIA

1. Potts GO, Creange JE, Harding HR, *et al.* Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis. *Steroids* 32: 257-267, 1978.
2. Witt AL, Neiger R. Adrenocorticotrophic hormone levels in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism following trilostane therapy. *Veterinary Record* 154: 399-400, 2004.
3. Sanders K, Kooistra HS, Galac S. Treating canine Cushing's syndrome: Current options and future prospects. *The Veterinary Journal* 241: 42-51, 2018.
4. Ramsey IK. Trilostane in dogs. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 40: 269-283, 2010.
5. Fracassi F, Mazzi A, Pietra M., *et al.* Terapia con trilostano in 23 cani affetti da iperadrenocorticismo. *Veterinaria* 21: 9-16, 2007.
6. Feldman EC. Evaluation of twice-daily lower-dose trilostane treatment administered orally in dogs with naturally occurring hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238: 1441-1451, 2011.
7. Feldman EC, Kass, PH. Trilostane dose versus body weight in the treatment of naturally occurring pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26: 1078-1080, 2012.
8. Cho KD, Kang JH, Chang D, *et al.* Efficacy of low- and high-dose trilostane treatment in dogs (< 5 kg) with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27: 91-98, 2013.
9. Bell R, Neiger R, McGrotty Y, *et al.* Study of the effects of once daily doses of trilostane on cortisol concentrations and responsiveness to adrenocorticotrophic hormone in hyperadrenocorticoïd dogs. *Veterinary Record* 159: 277-281, 2006.
10. Vaughan MA, Feldman EC, Hoar BR, *et al.* Evaluation of twice-daily, low-dose trilostane treatment administered orally in dogs with naturally occurring hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 232: 1321-1328, 2008.
11. Arenas C, Melian C, Perez-Alenza MD. Evaluation of 2 trilostane protocols for the treatment of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism: Twice daily versus once daily. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27: 1478-1485, 2013.
12. King JB, Morton, JM. Incidence and risk factors for hypoadrenocorticism in dogs treated with trilostane. *The Veterinary Journal* 230: 24-29, 2017.
13. Bermejo CA, Perez-Alenza MD, San José PG, *et al.* Laboratory assessment of trilostane treatment in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine, early view* 2020.
14. Pérez-Alenza D, Melián C. Hyperadrenocorticism in dogs. *Textbook of*

- Veterinary Internal Medicine*, 8th ed. (Ettinger, SJ, Feldman, EC and Côté, E. eds.), Elsevier, St. Louis, 1795-1811, 2017.
15. Augusto M, Burden A, Neiger R, *et al.* A comparison of once and twice daily administration of trilostane to dogs with hyperadrenocorticism. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere* 40: 415-424, 2012.
16. Arenas C, Melián C, Pérez-Alenza MD. Long-Term Survival of Dogs with Adrenal-Dependent Hyperadrenocorticism: A Comparison between Mitotane and Twice Daily Trilostane Treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28: 473-480, 2014.
17. Chapman PS, Kelly DF, Archer J, *et al.* Adrenal necrosis in a dog receiving trilostane for the treatment of hyperadrenocorticism. *Journal of Small Animal Practice* 45: 307-310, 2004.
18. Ramsey IK, Richardson J, Lenard Z, *et al.* Persistent isolated hypocortisolism following brief treatment with trilostane. *Australian Veterinary Journal* 86: 491-495, 2008.
19. Reusch CE, Sieber-Ruckstuhl N, Wenger M, *et al.* Histological evaluation of the adrenal glands of seven dogs with hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Veterinary Record* 160: 219-224, 2007.
20. Galac S, Reusch CE, Kooistra HS, *et al.* Adrenals. *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats: an illustrated text*, 2nd ed., 93-154, 2010.
21. Burkhardt WA, Gussetti 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.
22. Barker EN, Campbell S, Tebb AJ, *et al.* A comparison of the survival times of dogs treated with mitotane or trilostane for pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 810-815, 2005.
23. Fracassi F, Corradini S, Floriano D, *et al.* Prognostic factors for survival in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism treated with trilostane. *Veterinary Record*, 176: 49. doi: 10.1136/vr.102546. 2014.
24. Behrend Ellen N. Canine Hyperadrenocorticism. *Canine and Feline Endocrinology*, 4th ed. (Feldman, EC, Nelson, RW, Reusch, CE and Scott-Moncrieff, JCR.), Elsevier Saunders, St Louis, 377-451, 2015.
25. van Rijn SJ, Hanson JM, Zierikzee D, *et al.* The prognostic value of perioperative profiles of ACTH and cortisol for recurrence after transphenoidal hypophysectomy in dogs with corticotroph adenomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29: 869-876, 2015.
26. Teshima T, Hara Y, Takekoshi S, *et al.* Trilostane-induced inhibition of cortisol secretion results in reduced negative feedback at the hypothalamic-pituitary axis. *Domestic Animal Endocrinology* 36: 32-44, 2009.
27. Eastwood JM, Elwood CM, Hurley KJ. Trilostane treatment of a dog with functional adrenocortical neoplasia. *Journal of Small Animal Practice* 44: 126-131, 2003.
28. Bencheikroun G, de Fornel-Thibaud P, Lafarge S, *et al.* Trilostane therapy for hyperadrenocorticism in three dogs with adrenocortical metastasis. *Veterinary Record* 163: 190-192, 2008.
29. Galac S, Buijtsels JJ, Mol JA, *et al.* Effects of trilostane on the pituitary-adrenocortical and renin-aldosterone axis in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. *The Veterinary Journal* 183: 75-80, 2010.
30. Helm JR, McLauchlan G, Boden LA, *et al.* A comparison of factors that influence survival in dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism treated with mitotane or trilostane. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25: 251-260, 2011.
31. Midence JN, Drobatz KJ, Hess RS. Cortisol concentrations in well-regulated dogs with hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29: 1529-1533, 2015.
32. Lehnert C. 24 hour hormone and serum electrolyte levels of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane (*Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek Giessen*), 2007.
33. Bonadio CM, Feldman EC, Cohen TA, *et al.* Comparison of adrenocorticotrophic hormone stimulation test results started 2 versus 4 hours after trilostane administration in dogs with naturally occurring hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28: 1239-1243, 2014.
34. Griesch C, Lehnert C, Williams GJ, *et al.* Effect of trilostane on hormone and serum electrolyte concentrations in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28: 160-165, 2014.
35. Macfarlane L, Parkin T, Ramsey I. Pre-trilostane and three-hour post-trilostane cortisol to monitor trilostane therapy in dogs. *Veterinary Record* 179: 597, doi: 10.1136/vr.103744. 2016.
36. Boretti FA, Holzthum 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.
37. Cook AK, Bond KG. Evaluation of the use of baseline cortisol concentration as a monitoring tool for dogs receiving trilostane as a treatment for hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 237: 801-805, 2010.
38. Burkhardt WA, Boretti FS, Reusch CE, *et al.* Evaluation of baseline cortisol, endogenous ACTH, and cortisol/ACTH ratio to monitor trilostane treatment in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27: 919-923, 2013.
39. McGrotty YL, Arteaga A, Knottenbelt CM, *et al.* Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. *Veterinary Clinical Pathology* 34: 255-258, 2005.
40. 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.
41. Galac S, Buijtsels JJ, Kooistra HS. Urinary corticoid: creatinine ratios in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism during trilostane treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23: 1214-1219, 2009.
42. Ramsey IK, Fracassi F, Galac S, *et al.* The repeatability of various cortisol measurements in clinically stable dogs with hyperadrenocorticism being treated with trilostane. *Oral research communication of the 26th ECVIM-CA congress. Journal of Veterinary Internal Medicine*, 222, 2017.
43. Kempainen RJ, Sartin JL. Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *Journal of Endocrinology* 103: 219-226, 1984.
44. Boretti F, Musella C, Burkhardt W. Comparison of two prepill cortisol concentrations in dogs with hypercortisolism treated with trilostane. *BMC Veterinary Research* 14: 417, doi: 10.1186/s12917-018-1750-3, 2018.
45. Young RB, Bryson MJ, Sweat ML, *et al.* Complexing of DDT and o, p'DDD with adrenal cytochrome P-450 hydroxylating systems. *Journal of Steroid Biochemistry* 4: 585-591, 1973.
46. Veytsman I, Nieman L, Fojo T. Management of endocrine manifestations and the use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 27: 4619, 2009.
47. Kroiss M, Quinkler M, Lutz WK, *et al.* Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma. *Clinical Endocrinology* 75: 585-591, 2011.
48. Sbiera S, Leich E, Liebisch G, *et al.* Mitotane inhibits sterol-O-acyl transferase 1 triggering lipid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis in adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology* 156: 3895-3908, 2015.
49. Clemente M, De Andrés PJ, Arenas C, *et al.* Comparison of non-selective adrenocorticolysis with mitotane or trilostane for the treatment of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Veterinary Record*, 161: 805-809, 2007.
50. Kintzer PP, Peterson ME. Diagnosis and management of canine cortisol-secreting adrenal tumors. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 27: 299-307, 1997.
51. Creemers SG, Hofland LJ, Korpershoek E, *et al.* Future directions in the diagnosis and medical treatment of adrenocortical carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* 23: R43-R69, 2016.
52. Herrtage ME, Ramsey, IK. Canine hyperadrenocorticism. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology*, BSAVA Library, 167-189, 2012.
53. Pérez-Alenza D, Melián C. Hyperadrenocorticism in dogs. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 8th ed. (Ettinger, SJ, Feldman, EC and Côté, E. eds.), Elsevier, St. Louis, 1795-1811, 2017.
54. Flaseriu M, Castinetti F. Updates on the role of adrenal steroidogenesis inhibitors in Cushing's syndrome: a focus on novel therapies. *Pituitary* 19: 643-653, 2016.
55. Ciato D, Mumbach, AG, Paez-Pereda M, *et al.* Currently used and investigational drugs for Cushing's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 26: 75-84, 2017.
56. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, *et al.* The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, 257:5074: 1248-1251, 1992.

57. Clark AJ, Forfar R, Hussain M, *et al.* (2016). ACTH antagonists. *Frontiers in Endocrinology* 7: 101, 2016.
58. Ghaddhab C, Vuissoz JM, Deladoëy J. From bioinactive ACTH to ACTH antagonist: the clinical perspective. *Frontiers in Endocrinology* 8: 17, 2017.
59. Sanders K, Mol JA, Kooistra HS, *et al.* Melanocortin 2 receptor antagonists in canine pituitary-dependent hypercortisolism: in vitro studies. *Veterinary Research Communications* 42: 283-288, 2018.
60. Sanders K, Mol JA, Kooistra HS, *et al.* New insights in the functional zonation of the canine adrenal cortex. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30: 741-750, 2016.
61. Sanders K, de Wit WL, Mol JA. Abiraterone acetate for Cushing syndrome: study in a canine primary adrenocortical cell culture model. *Endocrinology* 159: 3689-3698, 2018.
62. Schimmer BP, White PC. Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Molecular Endocrinology*, 24.7: 1322-1337, 2010.
63. Chen WY, Juan, LJ, Chung BC. (2005). SF-1 (nuclear receptor 5A1) activity is activated by cyclic AMP via p300-mediated recruitment to active foci, acetylation, and increased DNA binding. *Molecular and Cellular Biology*, 25.23: 10442-10453, 2005.
64. Sanders K, Mol JA, Slob A, *et al.* Steroidogenic factor-1 inverse agonists as a treatment option for canine hypercortisolism: in vitro study. *Domestic animal endocrinology*, 63: 23-30.
65. Dominick MA, McGuire EJ, Reindel, *et al.* Subacute toxicity of a novel inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in beagle dogs. *Fundamental and Applied Toxicology*, 20.2: 217-224, 1993.
66. Naing A, Fu S, Habra MA, *et al.* ATR-101 phase 1 clinical study for adrenocortical carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33.15, 2015.
67. LaPensee CR, Mann JE, Rainey WE, *et al.* (2016). ATR-101, a selective and potent inhibitor of acyl-CoA acyltransferase 1, induces apoptosis in H295R adrenocortical cells and in the adrenal cortex of dogs. *Endocrinology*, 157.5: 1775-1788, 2016.
68. Burns VE, Kerppola TK. ATR-101 inhibits cholesterol efflux and cortisol secretion by ATP-binding cassette transporters, causing cytotoxic cholesterol accumulation in adrenocortical carcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 174.19: 3315-3332, 2017.
69. Kroiss M, Fassnacht M. Inhibition of cholesterol esterification in the adrenal gland by ATR101/PD132301-2, a promising case of drug repurposing. *Endocrinology*, 157.5: 1719-1721, 2016.
70. Langlois DK, Fritz MC, Schall WD, *et al.* ATR-101, a selective ACAT1 inhibitor, decreases ACTH-stimulated cortisol concentrations in dogs with naturally occurring Cushing's syndrome. *BMC Endocrine Disorders*, 18.1: 24, 2018.
71. de Bruin C, Hanson JM, Meij BP, *et al.* Expression and functional analysis of dopamine receptor subtype 2 and somatostatin receptor subtypes in canine Cushing's disease. *Endocrinology*, 149.9: 4357-4366, 2008.
72. Castillo VA, Gomez NV, Lalia JC, *et al.* Cushing's disease in dogs: Cabergoline treatment. *Research in Veterinary Science*, 85.1: 26-34, 2008.
73. Weckbecker G, Briner U, Lewis I, *et al.* SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs. *Endocrinology*, 143.10: 4123-4130, 2002.
74. Castillo V, Theodoropoulou M, Stalla J, *et al.* Effect of SOM230 (pasireotide) on corticotrophic cells: action in dogs with Cushing's disease. *Neuroendocrinology*, 94.2: 124-136, 2011.
75. Lottati M, Bruyette, DS. Outcomes of the addition of pasireotide to traditional adrenal-directed treatment for dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism secondary to macroadenoma: 9 cases (2013-2015). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 252.11: 1403-1408, 2018.
76. Colao A, Petersenn S, Newell-Price J, *et al.* A 12-month phase 3 study of pasireotide in Cushing's disease. *New England Journal of Medicine*, 366.10: 914-924, 2012.
77. Simeoli C, Auriemma RS, Tortora F, *et al.* The treatment with pasireotide in Cushing's disease: effects of long-term treatment on tumor mass in the experience of a single center. *Endocrine*, 50.3: 725-740, 2015.
78. Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52.3: 223-240. 2014.
79. Robben JH, Van den Brom WE, Mol JA. *et al.* Effect of octreotide on plasma concentrations of glucose, insulin, glucagon, growth hormone, and cortisol in healthy dogs and dogs with insulinoma. *Research in veterinary science*, 80.1: 25-32, 2006.
80. Plumb, DC. Plumb's veterinary drug handbook, 498-501, 2008.
81. Simeoli NR. New medical therapies on the horizon: oral octreotide. *Pituitary*, 20.1: 149-153, 2017.
82. Castillo V, Giacomini D, Pérez-Pereda M, *et al.* Retinoic acid as a novel medical therapy for Cushing's disease in dogs. *Endocrinology*, 147.9: 4438-4444, 2006.
83. Occhi G, Regazzo D, Albiger NM, *et al.* Activation of the dopamine receptor type-2 (DRD2) promoter by 9-cis retinoic acid in a cellular model of Cushing's disease mediates the inhibition of cell proliferation and ACTH secretion without a complete corticotroph-to-melanotroph trans-differentiation. *Endocrinology*, 155.9: 3538-3549, 2014.
84. Atmaca H, Isikli G, Senturk N, *et al.* (2014). Can bexarotene be a candidate drug for the medical therapy of Cushing's syndrome? In *Endocrine Abstracts*, 35, 211.