

# La Sindrome di Cushing nel cane: eziopatogenesi, sintomatologia e diagnosi

## RIASSUNTO

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

## INTRODUZIONE

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

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

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

## EPIDEMIOLOGIA

L'ipercortisolismo spontaneo è una patologia che colpisce solitamente soggetti di età compresa tra i 6 e i 20 anni<sup>2</sup>, si può tuttavia osservare anche in animali di giovane età. Colpisce tutte le razze con una certa predilezione per i cani di piccola taglia quali il Barbone nano, il Bassotto e soggetti di taglia più grande quale ad esempio il Boxer<sup>3</sup>. Circa il 75% dei cani con PDH pesa meno di 20 kg, mentre più del 50% dei soggetti con ADH pesa più di 20 kg<sup>4</sup>.

Il ruolo di fattori genetici nello sviluppo della patologia non è stato tuttora chiarito, tuttavia è stata dimostrata una familiarità nel Dandie Dinmont terriers e nel Bassotto tedesco a pelo duro<sup>5,6</sup>.

Nel cane l'incidenza di tale patologia è notevolmente più elevata rispetto all'uomo e al gatto<sup>7,8,9</sup>.

## EZIOPATOGENESI

### Ipercortisolismo ACTH-dipendente

#### Ipercortisolismo secondario a tumore ipofisario

L'ipercortisolismo ipofisi-dipendente o *pituitary dependent-hypercortisolism* (PDH) rappresenta la forma più comune nel cane e si osserva circa nell'85% dei casi<sup>3</sup>. Le lesioni ipofisarie che causano un eccesso di ACTH partono da piccoli nidi di cellule corticotrope patologiche fino ad arrivare a tumori notevolmente estesi. Nella maggior parte dei casi si tratta di adenomi inferiori a 10 mm; in alcuni soggetti l'adenoma

S. Corradini, DVM

F. Fracassi, DVM - PhD, Dipl. ECVIM-CA

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 03/03/2014 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 12/03/2014".

è così piccolo da non essere visualizzabile con la diagnostica per immagini avanzata; in tal caso si parla di microadenomi. Si tratta invece di macroadenomi quando raggiungono dimensioni superiori ai 10 mm; i carcinomi sono estremamente rari e sono definiti tali solo in presenza di metastasi extracraniche<sup>10,11,12</sup>.

Gli adenomi possono originare dal lobo anteriore (AL, anterior lobe) o dalla *pars intermedia* (PI) dell'ipofisi. Circa nel 20-25% dei casi si tratta di un tumore della PI e ciò risulta di importante interesse clinico. Questi tumori tendono infatti ad avere maggiori dimensioni ma anche differente controllo ormonale<sup>13</sup>. La PI è infatti sotto il diretto controllo neuronale dopaminergico e non presenta recettori per i glucocorticoidi<sup>14</sup>. Venendo pertanto a mancare il feed-back negativo del cortisolo, tali neoplasie tendono a crescere maggiormente. Per lo stesso motivo gli adenomi della PI risultano quindi resistenti alla soppressione con desametasone<sup>10</sup>.

### **Produzione di ACTH ectopico**

Nell'uomo questa forma si riscontra in seguito a tumori neuroendocrini maligni quali carcinomi polmonari, bronchiali, timici, pancreatici o tiroidei<sup>15</sup>. Nel cane tale forma è stata documentata solo in un Pastore Tedesco di 8 anni nel quale il tessuto ipofisario, analizzato dopo ipofisectomia, non risultava essere adenomatoso. In questo caso l'ipersecrezione di ACTH era legata a una neoplasia pancreatica ACTH secernente<sup>16</sup>.

### **Ipercortisolismo ACTH indipendente**

#### **Ipercortisolismo secondario a tumore surrenalico**

Circa il 15% dei cani affetti da ipercortisolismo presenta un tumore corticosurrenalico (adrenal tumor, AT) o *adrenal dependent hypercortisolism* (ADH). Dal punto di vista istologico queste neoplasie possono essere adenomi o carcinomi, nonostante tale distinzione non risulti sempre netta<sup>17</sup>. Nella maggior parte dei casi si tratta di neoplasie unilaterali che interessano con pari incidenza la surrenale destra o sinistra. I tumori bilaterali sono molto più rari e sono stati descritti nel 10% degli ADH<sup>18,19</sup>. L'ADH si osserva solitamente in cani di età medio-adulta, più spesso di grossa taglia e non sembra esservi una predisposizione di sesso. Va segnalato che alcuni tumori surrenalici, in particolare i carcinomi, possono secernere ormoni sessuali<sup>20</sup>. Nel cane è stata descritta anche la concomitante presenza di tumori corticosurrenalici secernenti cortisolo ed aldosterone<sup>21,22</sup> o cortisolo e catecolamine<sup>23</sup>. Infine, sono stati segnalati casi con simultanea presenza di ADH e PDH<sup>24,25</sup>.

#### **Ipercortisolismo iatrogeno**

Questa condizione si verifica in seguito alla somministrazione prolungata o eccessiva di glucocor-

ticoidi esogeni. Ciò che ne risulta sono i classici sintomi della SC, una soppressione dei livelli di ACTH plasmatici e conseguente atrofia surrenalica della zona fascicolata e reticolare. La sensibilità nei confronti dei glucocorticoidi esogeni è piuttosto individuale e non prevedibile.

### **Ipercortisolismo secondario alla presenza di recettori aberranti**

Nell'uomo l'ipercortisolismo può essere secondario ad una forma di espressione ectopica o sovraespressione eutopica di recettori surrenalici<sup>26</sup>. In medicina umana sono stati descritti differenti recettori corticosurrenalici correlati alla steroidogenesi, inclusi quelli per il GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide), le catecolamine, la vasopressina, la serotonina ed i recettori per l'ormone luteinizzante<sup>27</sup>. Recentemente è stato descritto un caso di un cane Vizsla di 6 anni con ipercortisolismo alimento-dipendente, nel quale l'espressione aberrante di recettori per il GIP era la causa dell'ipercortisolismo. In tale soggetto l'ipersecrezione di cortisolo non era legata alla stimolazione da parte dell'ACTH bensì da parte del GIP, un peptide gastrico che aumenta in seguito alla somministrazione del pasto<sup>28</sup>.

## **MANIFESTAZIONI CLINICHE**

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

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

La maggior parte dei cani (80-90%) con Sindrome di Cushing viene portata in visita per l'insorgenza di **poliuria e polidipsia** (pu/pd)<sup>2</sup>. Tali sintomi sono legati ad un'incapacità nel concentrare le urine; il cortisolo interferisce infatti con la secrezione e l'azione dell'ormone antidiuretico (ADH) con conseguente iso o ipostenuria<sup>29</sup>. In corso di macroadenoma ipofisario la compressione meccanica della massa sull'ipotalamo e sulla neuroipofisi può ulteriormente compromettere la secrezione di ADH rendendo ancor più evidente il diabete insipido secondario a SC<sup>30,31</sup>. Un altro sintomo estremamente comune, riportato in una percentuale che va dall'84 al 91% dei casi è la **polifagia**<sup>32,33,34</sup>. L'aumento di volume dell'addome, il cosiddetto **"addome a botte"** (Figura 1), caratteristico segno clinico nell'uomo, si osserva in una percentuale di cani che va dal 51 al 75%<sup>32,34</sup> ed è secondario all'indebolimento della muscolatura addominale, ad un accumulo di grasso, ad epatomegalia e al fatto che la vescica risulti frequentemente repleta.

L'**atrofia muscolare** è causata dall'incremento del catabolismo proteico secondario all'eccesso di glucocorticoidi e verosimilmente anche dalla soppressa secrezione di ormone somatotropo (GH, growth hormone) che si osserva in questi animali<sup>35</sup>. Le alterazioni cutanee includono: mancata ricrescita del pelo dopo tricotomia, diradamento del mantello fino allo sviluppo della classica **alopecia simmetrica e bilaterale** (Figure 1 e 2) che solitamente interessa tronco e addome, risparmiando testa ed arti. L'ipercortisolismo causa infatti atrofia follicolare e pilosebacea determinando la caduta del pelo e la sua mancata ricrescita. La cute si può presentare **sottile, ipoelastica**, con evidenza della sottostante trama vascolare e tendenza a sviluppare ecchimosi ed ematomi. L'immunosoppressione indotta dall'ipercortisolismo aumenta inoltre la suscettibilità alle infezioni secondarie: batteriche, micotiche e parassitarie<sup>3</sup>. Meno comunemente si riscontrano comedoni ed iperpigmentazione<sup>3</sup>.

Un rilievo meno comune è la **calcinosis cutis** (CC) (Figura 3), ovvero la deposizione distrofica di sali di calcio nel derma, epidermide o sottocute che si localizza a livello della regione temporale, linea mediana dorsale, collo e addome. L'esatto meccanismo patogenetico della CC non è ancora del tutto chiarito; si suppone che lo stato ipercortisolemico determini una maggior attività di gluconeogenesi e catabolismo proteico sulle fibrille di collagene con formazione di una matrice che tende ad attrarre e legare gli ioni calcio. Questa alterazione cutanea si può osservare anche in soggetti affetti da ipercortisolismo iatrogeno<sup>36</sup>.

**Dispnea e tachipnea** che spesso si osservano nei soggetti con SC sono secondarie alla ridistribuzione del grasso a livello toracico e alla debolezza che coinvolge anche i muscoli respiratori. L'aumento di volume dell'addome esercita inoltre una pressione sul diaframma accentuando la difficoltà respiratoria. Altre cause di sintomi respiratori sono la presenza di mineralizzazioni dell'interstizio polmonare e tromboembolismo polmonare<sup>3</sup>.

Sintomi meno frequenti sono l'**atrofia testicolare** nel maschio e l'**anestro** nella femmina<sup>3</sup>.

Più raramente i cani affetti da SC sviluppano **miotonie o pseudomotonie** caratterizzate da contrazioni e rigidità muscolare che conferiscono al soggetto un'andatura rigida soprattutto a carico degli arti posteriori (Figura 4). Nei cani affetti da macroadenoma la compressione delle strutture nervose circostanti può determinare la comparsa di **sintomi neurologici** quali circling, atassia, tetraparesi ed head pressing fino a crisi convulsive<sup>3</sup>. Nella Tabella 1 sono descritti i segni clinici più e meno comunemente associati alla SC.

## Diagnostica di laboratorio

### Esame emocromocitometrico

In circa l'80% dei cani con SC si osserva linfopenia ed eosinopenia e nel 20-25% si assiste unicamen-



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



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



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





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

te ad un incremento del numero totale dei leucociti<sup>3</sup>. Questi sono tutti elementi caratteristici del così detto *leucogramma da stress*.

Comunemente si riscontra anche un incremento del numero delle piastrine<sup>3</sup>.

## Profilo biochimico

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

L'epatopatia indotta dai corticosteroidi ed una parziale induzione enzimatica determinano un incremento dell'ALT (alanina-aminotransferasi) che si accompagna spesso a valori di AST (aspartato-aminotransferasi) nella norma. Circa nel 70% dei

casi si osserva inoltre un aumento della GGT (gamma glutamil transferasi). I glucocorticoidi stimolano la lipolisi determinando un incremento dei trigliceridi e colesterolo, condizione osservabile in più del 50% dei soggetti. In alcuni casi può essere presente una lieve iperglicemia a digiuno; tale fenomeno è secondario all'insulino-resistenza cortisolo indotta e all'aumento della gluconeogenesi epatica. Nonostante ciò, la SC sfocia in un vero e proprio diabete mellito solo nel 5-10% dei soggetti. L'aumento della diuresi può causare perdita urinaria di urea che può risultare pertanto bassa a livello sierico. Contrariamente a ciò che accade nell'uomo, un'alterazione che si osserva circa nel 40% dei cani con Sindrome di Cushing è l'iperfosfatemia<sup>37</sup>.

## Esame delle urine

L'85% dei cani con SC presenta un peso specifico urinario inadeguato, nella maggior parte dei casi isostenurico, talvolta anche ipostenurico<sup>3,38</sup>. Riscontro comune (>70% dei casi) è anche una marcata proteinuria con rapporto proteine-creatinina urinari (UPC) che oscilla tra 1.0-6.0<sup>39</sup>. In circa il 40-50% dei soggetti si osservano infezioni del tratto urinario, presumibilmente correlate all'immunodepressione e alla presenza di intensa poliuria e polidipsia. Risulta pertanto opportuno inserire l'urinocoltura come parte integrante del work-up diagnostico iniziale<sup>40</sup>.

## Diagnosi di ipercortisolismo

La diagnosi di ipercortisolismo si basa sulla conferma di 2 caratteristiche: 1) *aumento della produzione di cortisolo* o 2) *diminuita sensibilità al feedback dei glucocorticoidi*. Nessun test ha il 100% di accuratezza diagnostica e pertanto risulta importante effettuare i test endocrini specifici solo in soggetti con sintomatologia clinica compatibile con la patologia. Partendo da una popolazione accuratamente selezionata, la prevalenza della SC sarà pertanto maggiore e tutti i test diagnostici risulteranno più accurati<sup>41</sup>.

TABELLA I

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

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

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

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

### Test di stimolazione con ACTH

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

Si basa sulla valutazione della cortisolemia prima ed un'ora dopo la somministrazione endovenosa o intramuscolare di ACTH sintetico (tetracosactide esacetato). In letteratura sono stati descritti numerosi protocolli che utilizzano differenti dosaggi dell'ACTH sintetico; è fondamentale che venga somministrata una dose sovra-fisiologica. Uno studio ha evidenziato che un dosaggio di 5 µg/kg risulta adeguato per effettuare il test<sup>42</sup>. Da maggio 2013 il Synacthen®, nome commerciale del tetracosactide esacetato, è stato tolto dal commercio in gran parte dell'Europa. Risulta tuttavia ancora disponibile come preparazione galenica.

Utilizzando le più comuni tecniche di determinazione ormonale (es. chemiluminescenza) un cane sano presenta valori basali di cortisolo ematico compresi tra 0,5 e 6,0 µg/dl. Tipicamente i valori post-stimolazione sono compresi tra 6 e 17 µg/dl. Valori post-stimolazione che vanno da 17 a 22 µg/dl sono considerati dubbi e non diagnostici, invece, valori post-stimolazione superiori a 22 µg/dl rendono positivo il test e sono suggestivi di ipercortisolismo. Soggetti affetti da ipercortisolismo iatrogeno mostrano valori basali di cortisolo ema-

tico bassi o normali, tuttavia tali concentrazioni non subiscono variazioni in seguito alla somministrazione di ACTH esogeno.

La sensibilità del test varia notevolmente nei vari studi e va dal 57% al 95% risultando comunque più bassa nelle forme surrenaliche; la specificità dipende molto dalla popolazione di soggetti testati e varia dal 59-93%<sup>4,21,43,44,45,46</sup>. È stato osservato infatti come i falsi positivi aumentino in corso di malattie concomitanti quali malattie renali croniche, diabete mellito, malnutrizione e vari altri stati patologici; soggetti con patologie concomitanti mostrano pertanto una specificità al test medio-bassa<sup>47</sup>. Questo test è comunemente utilizzato per il monitoraggio terapeutico dei soggetti con SC sottoposti a terapia con trilostano o mitotano.

La determinazione del cortisolo è comunemente eseguita su campioni di siero o plasma EDTA tramite metodiche validate nel cane; la metodica più utilizzata nei laboratori italiani è quella a chemiluminescenza e meno comunemente il RIA (radioimmunoassay). Alcuni laboratori stanno inoltre iniziando ad utilizzare in modo routinario anche la spettrometria di massa. Il cortisolo sierico è un ormone stabile, tuttavia, nel caso in cui il campione venga spedito ad un laboratorio esterno, è bene che viaggi refrigerato. Per la valutazione della cortisolemia non è strettamente necessario il digiuno dell'animale prima del prelievo, tuttavia è opportuno non utilizzare sieri evidentemente lipemici.

### LDDS test

Il razionale di questo test è rappresentato dal fatto che in cani senza SC la somministrazione di desametasone sopprime la produzione di cortisolo endogeno; nei soggetti con SC, invece, la soppressione risulta assente o soltanto parziale<sup>10</sup>. Prevede la valutazione del cortisolo sierico prima (T0) e dopo 4 (T4) e 8 (T8) ore dalla somministrazione endovenosa di 0,01 mg/kg di desametasone. La cortisolemia a T8 permette di confermare la diagnosi di ipercortisolismo: il test viene considerato negativo se la cortisolemia a T8 risulta inferiore a 1 µg/dl. Valori compresi tra 1 µg/dl e 1,4 µg/dl indicano una risposta dubbia al test e valori superiori a 1,4 µg/dl, invece, sono suggestivi di SC. La cortisolemia rilevata dopo 4 ore può risultare utile nel differenziare una forma ipofisaria da una surrenalica. Nei cani con ADH la somministrazione di desametasone non ha alcun effetto sui livelli già bassi di ACTH e pertanto non si osservano rilevanti decrementi della cortisolemia a T4. In cani affetti da PDH, la somministrazione di desametasone può determinare quadri differenti per quanto riguarda la cortisolemia a 4 ore. Nel 20% dei soggetti, al pari di ciò che accade nelle forme surrenaliche, non si verifica alcuna soppressione del cortisolo ematico; in un altro 20% si ha una lieve soppressione; nel 30-40% dei casi di PDH il T4 risulta inferiore del 50% rispetto al cortisolo basale

ma non inferiore a 1,4 µg/dl, nel restante 25% dei PDH il cortisolo ematico a 4 ore scende a livelli inferiori a 1,4 µg/dl. Nei casi di assente o minima soppressione della cortisolemia a T4 risulterà impossibile (valutando solo questo test) distinguere PDH da ADH. Ne consegue che solo nel 60% dei cani affetti da PDH si ottiene una risposta chiara sulla localizzazione già al test di soppressione<sup>3</sup>. Nei soggetti affetti da ADH, invece, non si ha alcuna soppressione della produzione di cortisolo da parte delle surrenali. Uno dei vantaggi di questo test è rappresentato dall'alta sensibilità che si aggira tra l'85 e il 100%<sup>4,43,48,49,50</sup>. La specificità, come per il test di stimolazione, varia in relazione alla popolazione selezionata, andando dal 44% in cani con malattie concomitanti<sup>43</sup> fino al 73% in soggetti attentamente selezionati in base ai segni clinici e laboratoristi indicativi di ipercortisolismo<sup>3</sup>.

#### Rapporto cortisolo:creatinina urinari

Questo test si basa sul principio che l'escrezione urinaria di creatinina è piuttosto costante nelle 24 ore e pertanto il rapporto tra cortisolo e creatinina elimina l'interferenza del volume urinario. Questo rapporto riflette quindi il valore della cortisolemia all'incirca delle 8 ore precedenti la raccolta delle urine<sup>51</sup>. Per confermare l'ipercortisolemia sarebbe opportuno analizzare due campioni di urina prelevati al mattino in due giorni consecutivi. La raccolta delle urine deve essere eseguita a casa dal proprietario per caduta, e non prima di due giorni dopo la visita in clinica, onde evitare ogni fonte di stress per l'animale. La sensibilità di questo test varia dal 75% al 100%<sup>43,52,53,54</sup>. La differenza tra questi valori è dovuta principalmente alle diverse metodiche utilizzate per misurare il cortisolo e la creatinina urinari, dalla tecnica di prelievo delle urine e dall'ora nella quale è effettuato il prelievo. La specificità di questo test differisce molto a seconda degli studi e sono stati riportati valori dal 20-25%<sup>43,53,52</sup> fino al 77% nel caso in cui l'esame si effettui su una popolazione adeguatamente selezionata (segni clinici e laboratoristici compatibili di SC)<sup>48</sup>. È considerato un buon test di screening per l'alta sensibilità, il poco tempo richiesto e la facilità nell'esecuzione. Vista l'elevata sensibilità, a fronte di una bassa specificità, risulta maggiormente utile come test di esclusione della patologia.

#### HDDS test e HDDS test su urine

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

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

L'HDDST può inoltre essere effettuato valutando il rapporto cortisolo creatinina urinari<sup>56</sup>. Il protocollo prevede la raccolta delle urine per due giorni consecutivi, poi, dopo aver raccolto quelle del secondo giorno, il proprietario verrà istruito affinché somministri PO al proprio cane 0,1 mg/kg di desametasone ogni 8 ore. La mattina del terzo giorno viene collezionato un ulteriore campione di urine. Nei tre campioni viene valutato il rapporto cortisolo/creatinina urinario. Il risultato dei primi due campioni serve per capire se vi sia o meno la patologia. Nel caso in cui il risultato dell'UCCR del terzo campione risulti inferiore al 50% della media dei valori dei due campioni prelevati i due giorni precedenti, l'animale ha un PDH oppure non è affetto da ipercortisolismo; in quest'ultimo caso le elevate concentrazioni di cortisolo urinario potrebbero essere legate a stress o ad altre patologie. Nel caso in cui, invece, il terzo valore non risulti soppresso per più del 50% della media dei primi due valori si è di fronte ad un'ipercortisolemia non sopprimibile e vi è il 50% di possibilità che si tratti di un PDH e un 50% di probabilità che sia un ADH<sup>56</sup>.

#### ACTH endogeno

La misurazione dell'ACTH plasmatico è il test più accurato per differenziare in caso di AT. In caso di PDH e di secrezione ectopica di ACTH i livelli della corticotropina endogena risultano essere superiori a quelli fisiologici. Questo si verifica nell'85-90% dei casi delle neoplasie ipofisarie, con un 10-15% di soggetti che mostrano dei livelli che rimangono tuttavia nei ranges di normalità<sup>57</sup>. Nel caso invece di neoplasie surrenaliche o di ipercortisolismo iatrogeno le quantità di ACTH nel sangue risultano inferiori ai 10 pg/ml e frequentemente al di sotto del limite inferiore di capacità di rilevazione del test<sup>57</sup>. Particolari accorgimenti devono essere adottati per il campione ematico, essendo l'ACTH facilmente degradato dalle proteasi plasmatiche se il campione non è adeguatamente processato. Il campione dovrà pertanto essere collezionato in provette con EDTA siliconate e preventivamente raffreddate, mantenute in ghiaccio dopo il prelievo fino alla processazione. Se il campione viene inviato a un laboratorio esterno è necessario accertarsi che sia utilizzata una meto-

dica validata per il cane, e che il campione arrivi congelato. In alternativa può essere aggiunto uno specifico preservante (aprotinina).

### Nuove prospettive diagnostiche

Al pari di ciò che accade in medicina umana, anche in veterinaria recenti studi hanno valutato la possibilità di utilizzare nuove metodiche, idealmente meno invasive per la diagnosi di SC nel cane. Come parametro potenzialmente utile è stato testato il cortisolo salivare. Le concentrazioni di cortisolo nella saliva di cani con SC risultano maggiori rispetto ai cani sani, tuttavia il maggior limite per l'utilizzo di tale metodica riguarda il campionamento del substrato che non risulta di semplice esecuzione<sup>58</sup>. Studi recenti hanno invece valutato il pelo come possibile matrice su cui testare i livelli di cortisolo, mettendo in evidenza come le concentrazioni di cortisolo nei cani con SC siano più elevate rispetto a soggetti sani e malati<sup>59,60</sup>.

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

### Diagnostica per immagini

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

### Ecografia addominale

Attraverso l'ecografia addominale è possibile valutare direttamente forma e volume delle surrenali, allo stesso tempo è possibile stabilire la presenza di altre alterazioni conseguenti o meno all'ipercortisolismo. Epatomegalia con segni di epatopatia, vescica repleta e calcolosi vescicale sono i reperti più comuni<sup>3</sup>. In particolare, il diametro del polo caudale surrenalico è il criterio comunemente utilizzato per valutare l'aumento di volume della ghiandola, ed è considerato normale fino a 7,4 mm<sup>61</sup>. Recenti studi hanno tuttavia valutato la possibilità di giudicare le dimensioni surrenaliche anche sulla base della taglia dell'animale<sup>62</sup>. L'ecografia, essenziale in corso di AT, può valutarne le dimensioni, l'invasione vascolare e dei tessuti locali. Moderata asimmetria, atrofia della ghiandola controlaterale con normale ecostruttura o la combinazione di una o più caratteristiche è indicativa di AT. In corso di AT la surrenale contro laterale risulta solitamente avere un diametro del polo caudale <5 mm<sup>63</sup>. Inoltre, ecograficamente non è possibile distinguere tra un'iperplasia macronodulare

da un AT. Sebbene la maggior parte dei AT siano unilaterali, come sopra riportato, esistono anche forme bilaterali. In presenza di AT, i caratteri di malignità includono metastasi toraciche e/o addominali e masse surrenaliche con un diametro >4 cm<sup>41,64</sup>. Non bisogna dimenticare che in corso di PDH è possibile riconoscere surrenali normali o aumentate di volume talvolta accompagnate da moderata asimmetria<sup>65</sup>.

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

In tutti i soggetti con diagnosi di PDH sarebbe opportuno valutare direttamente l'ipofisi mediante tecniche di diagnostica per immagini avanzate; oltre a dare un importante ausilio diagnostico, tali metodiche forniscono utili informazioni in merito alla possibile opzione terapeutica e alla prognosi. Il primo segno di un aumento di volume ipofisario è solitamente l'incremento di volume in altezza. Le lesioni ipofisarie in corso di PDH vanno da poche cellule iperplastiche (microadenomi) fino a grandi tumori (macroadenomi) (Figura 5)<sup>66</sup>. La somministrazione di mezzo di contrasto in un cane con ipofisi di dimensioni normali permette inizialmente l'identificazione dell'ipofisi posteriore con il caratteristico "pituitary flush". L'assenza di tale caratteristica indica invece un'atrofia dell'ipofisi posteriore secondaria a compressione di un tumore ipofisario. Una distorsione o uno spostamento del "pituitary flush" può essere usato per localizzare microtumori ipofisari localizzati anteriormente<sup>67</sup>. Le dimensioni dell'ipofisi sono piuttosto variabili tra le razze, tuttavia il rapporto tra l'altezza dell'ipofisi e l'area cerebrale ovvero il P:B ratio (rap-

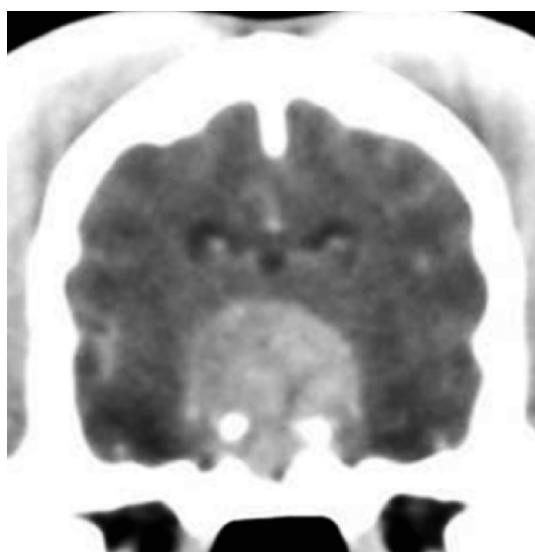


FIGURA 5 - Tomografia computerizzata del cranio in un cane meticcio maschio di 8 anni affetto da ipercortisolismo ipofisi dipendente. Nell'immagine post-contrasto, ottenuta a livello di diencefalo, è evidente una massa occupante spazio nella regione ipotalamico-ipofisaria.



porto P:B) permette di discriminare tra ipofisi ingrandita ( $P:B > 0,31$ ) e normale ( $P:B \leq 0,31$ )<sup>10</sup>. Mediante TC vengono messe in evidenza il 50-60% delle neoplasie ipofisarie, mentre nel rimanente 40-50% per le dimensioni contenute non è rilevata alcuna neoformazione<sup>2</sup>. Nei soggetti con sintomatologia clinica compatibile alla presenza di macrotumori diventa essenziale eseguire una TC o MRI per pianificare interventi terapeutici quali l'ipofisectomia o la radioterapia. In particolare la CT permette una miglior visualizzazione dei punti di repere ossei essenziali nel caso in cui si scelga l'ipofisectomia transfenoidale<sup>68,69</sup>. Al contrario, la MRI permette una miglior evidenza dei tessuti molli ed ha miglior sensibilità per l'individuazione di microadenomi<sup>66</sup>.

## Parole chiave

*Ipofisi, malattia di Cushing, iperadrenocorticismo, ghiandole surrenali, cortisolo, ACTH, poliuria-polidipsia.*

## Canine Cushing's Syndrome: etiopathogenesis, symptomatology and diagnosis

### Summary

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

### Key words

*Pituitary gland, Cushing's disease, hyperadrenocorticism, adrenal glands, cortisol, ACTH, polyuria-polydipsia.*

## BIBLIOGRAFIA

- Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). *Bull Johns Hopkins Hospital* 50: 137-195, 1932.
- Melian C, Pérez-Alenza MD, Peterson ME. Hyperadrenocorticism in dogs. In Ettinger SJ, Feldman EC (eds): *Textbook of Veterinary Internal Medicine, Disease of Dog and Cat*, ed 7. Elsevier, 2010, pp. 1816-1840.
- Feldman EC, Nelson RW. Canine hyperadrenocorticism. In *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, ed 3: St. Louis, WB Saunders, 2004 pp. 252-319.
- Reusch CE, Feldman EC. Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5:3-10, 1991.
- Stritzel S, Mischke R, Philipp U et al. Familial canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism in wirehaired Dachshunds. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 121:349-58, 2008.
- Scholten-Sloof BE, Knol BV, Rijnberk A et al. Pituitary-dependent hyperadrenocorticism in a family of Dandie Dinmont terriers. *The Journal of Endocrinology* 135:535-42, 1992.
- Willeberg P and Priester WA. Epidemiological aspects of clinical hyperadrenocorticism in dogs (canine Cushing's syndrome). *Journal of American Animal Hospital Association* 18:717-724, 1982.
- Hatipoglu BA. Cushing's Syndrome. *Journal of Surgical Oncology* 106:565-571, 2012.
- Fracassi F, Mandrioli L, Diana A et al. Pituitary macroadenoma in a cat with diabetes mellitus, hypercortisolism and neurological signs. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* 54:359-363, 2007.
- Kooistra HS, Voorhout G, Mol JA et al. Correlation between impairment of glucocorticoid feedback and the size of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *The Journal of Endocrinology* 152:387-94, 1997.
- Hanson JM, van't Hoofd MM, Voorhout G et al. Efficacy of transphenoidal hypophysectomy in treatment of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19:687-694, 2005.
- Hanson JM, Teske E, Voorhout G et al. Prognostic factors for outcome after transphenoidal hypophysectomy in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Neurosurgery* 107:830-840, 2007.
- Peterson ME, Krieger DT, Drucker WD et al. Immunocytochemical study of the hypophysis of 25 dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Acta Endocrinologica* 101:15-24, 1982.
- Antakly T, Sasaki A, Liotta AS et al. Induced expression of the glucocorticoid receptor in the rat intermediate pituitary lobe. *Science* 229:277-279, 1985.
- Terzolo M, Reimondo G, Ali A et al. Ectopic ACTH syndrome: molecular bases and clinical heterogeneity. *Annals of Oncology* 12:S83-87, 2001.
- Galac S, Kooistra HS, Voorhout G et al. Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domestic Animal Endocrinology* 28:338-348, 2005.
- Bernard MH, Sidhu S, Berger N et al. A case report in favour of multistep adrenocortical tumorigenesis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14:151-156, 2003.
- Ford SL, Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism caused by bilateral adrenocortical neoplasia in dogs: Four cases (1983-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 202:789-792, 1993.
- Hoerauf A, Reusch CE. Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 35:193-199, 1999.
- Hill KE, Scott-Moncrief JC, Koshko MA et al. Secretion of sex hormones in dogs with adrenal dysfunction. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226:556-56, 2005.
- Behrend EN, Kemppainen RJ, Boozer AL et al. Serum 17-alpha-hydroxyprogesterone and corticosterone concentrations in dogs with nonadrenal neoplasia and dogs with suspected hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 11:1762-1767, 2005.
- Machida T, Uchida E, Matsuda K et al. Aldosterone-, corticosterone and cortisol- secreting adrenocortical carcinoma in a dog: case report. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 70:317-320, 2008.
- Von Dehn BJ, Nelson RW, Feldman EC et al. Pheochromocytoma and hyperadrenocorticism in dogs: six cases (1982-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207:322-324, 1995.
- Greco DS, Peterson ME, Davidson AP et al. Concurrent pituitary and adrenal tumors in dogs with hyperadrenocorticism: 17 cases (1978-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214:642-647, 1999.
- Thuröczy J, van Sluijs FJ, Kooistra HS et al. Multiple endocrine neoplasia in a dog: corticotrophic tumor, bilateral adrenocortical tumors, and pheochromocytoma. *Veterinary Quarterly* 20:56-61, 1998.
- Lacroix A, Bourdeau I, Lampron A. Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clinical Endocrinology* 73:1-15, 2010.
- Lacroix A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Best Practice Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 23:245-259, 2009.



29. Galac S, Kars VJ, Voorhout G et al. ACTH independent hyperadrenocorticism due to food dependent hypercortisolemia in a dog: a case report. *The Veterinary Journal* 177:141-143, 2008.
30. Galac S, Reusch CE, Kooistra HS et al. Adrenals. In Rijnberk A, Kooistra HS. *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats. An illustrated text.* Hannover: Schlutersche 2010, pp. 93-154.
31. Ferguson DC e Biery DN. Diabetes insipidus and hyperadrenocorticism associated with high plasma adrenocorticotropin concentration and a hypothalamic/pituitary mass in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193: 835-839, 1988.
32. Harb MF, Nelson RW, Feldman EC et al. Central diabetes insipidus in dogs: 20 cases (1986-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209:1884-1888, 1996.
33. 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.
34. Ruckstuhl NS, Nett C, Reusch C. Results of clinical examinations, laboratory tests, and ultrasonography in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *American Journal of Veterinary Research* 63:506-512, 2002.
35. Alenza DP, Arenas C, Lopez ML et al. Long-term efficacy of trilostane administered twice daily in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Journal of the American Animal Hospital Association* 42:269-276, 2006.
36. Meij BP, Mol JA, Bevers MM et al. Alterations in anterior pituitary function of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Endocrinology* 154:505-512, 1997.
37. Doerr KA, Outerbridge CA, White SD et al. Calcinosis cutis in dogs: histopathological and clinical analysis of 46 cases. *Veterinary Dermatology* 24:355-379, 2013.
38. Ramsey IK, Tebb A, Harris EJ et al. Hyperparathyroidism in dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of Small Animal Practice* 46:531-536, 2005.
39. Peterson ME. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 22:2-11, 2007.
40. Mazzi A, Fracassi F, Dondi F et al. Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Veterinary Research Communications* 32:299-301, 2008.
41. Forrester SD, Troy GC, Dalton MN et al. Retrospective evaluation of urinary tract infection in 42 dogs with hyperadrenocorticism or diabetes mellitus or both. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13:557-560, 1999.
42. Behrend EN, Kooistra HS, Nelson R et al. Diagnosis of Spontaneous Canine Hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement (Small Animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:1292-1304, 2013.
43. Behrend EN, Kemppainen RJ, Bruyette DS et al. Intramuscular administration of a low dose of ACTH for ACTH stimulation testing in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229:528-530, 2006.
44. Kaplan AJ, Peterson ME, Kemppainen RJ. Effects of disease on the results of diagnostic tests for use in detecting of hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207:445-451, 1995.
45. Feldman EC. Comparison of ACTH response and dexamethasone suppression as screening tests in canine hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 182:506-510, 1983.
46. van Liew CH, Greco DS, Salman MD. Comparison of results of adrenocorticotrophic hormone stimulation and low-dose dexamethasone suppression test with necropsy findings in dogs: 81 cases (1985-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211:322-325, 1997.
47. Monroe WE, Panciera DL, Zimmerman KL. Concentrations of non cortisol adrenal steroids in response to ACTH in dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism, pituitary dependent hyperadrenocorticism, and nonadrenal illness. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26:945-952, 2012.
48. Kaplan AJ., Peterson ME. Effects of non adrenal disease on adrenal function tests in dogs. In: Bonagura JD (ed): *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice.* Philadelphia, WB Saunders Company, 2000.
49. Rijnberk A, Van Wees A, Mol JA. Assessment of two tests for the diagnosis of canine hyperadrenocorticism in dogs. *The Veterinary Record* 122:178-180, 1988.
50. Chastain CB, Franklin RT, Ganjam VK, Madsen RW. Evaluation of the hypothalamic pituitary-adrenal axis in clinically stressed dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 22:435-442, 1986.
51. Feldman EC, Feldman MS, Nelson RW. Use of low- and high-dose dexamethasone tests for distinguishing pituitary-dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209:772-775, 1996.
52. Van Vonderen IK, Kooistra HS, Rijnberk A. Influence of veterinary care on the urinary corticoid:creatinine ratio in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12:431-435, 1998.
53. Smiley LE, Peterson ME. Evaluation of a urine cortisol:creatinine ratio as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7:163-168, 1993.
54. Feldman EC, Mack RE. Urine cortisol:creatinine ratio as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200:1637-1641, 1992.
55. Jensen AL, Iverson L, Koch J, et al. Evaluation of the urinary cortisol: creatinine ratio in the diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 38:99-102, 1997.
56. Gilor C, Graves TK. Interpretation of laboratory tests for canine Cushing's syndrome. *Topics in Companion Animal Medicine* 26:98-108, 2011.
57. Galac S, Kooistra HS, Teske E et al. Urinary corticoid/creatinine ratios in the differentiation between pituitary dependent hyperadrenocorticism and hyperadrenocorticism due to adrenocortical tumor in the dog. *Veterinary Quarterly* 19:17-20, 1997.
58. Rodriguez Pineiro MI, Bechenkroun G., De Fornel-Thibaud P et al. Accuracy of an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) immunoluminometric assay for differentiating ACTH- dependent from ACTH-independent hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23:850-855, 2009.
59. Wenger-Riggenbach B, Boretti FS, Quante S et al. Salivary cortisol concentrations in healthy dogs and dogs with hypercortisolism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24:551-556, 2010.
60. Corradini S, Accorsi PA, Boari A et al. Evaluation of hair cortisol in the diagnosis of hypercortisolism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:1268-1272, 2013.
61. Ouschan C, Kuchar A, Möstl E et al.: Measurement of cortisol in dog hair: a noninvasive tool for the diagnosis of hypercortisolism. *Veterinary Dermatology* 24:428-431, 2013.
62. Barthez PY, Nyland TG, Feldman EC. Ultrasonography of the adrenal glands in the dog, cat, and ferret. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 28:869-85, 1998.
63. Morigato G, Layssol-Lamour C, Conchou F et al. Ultrasonographic evaluation of the adrenal glands in healthy dogs: repeatability, reproducibility, observer-dependent variability, and the effect of body-weight, age and sex. *The Veterinary Record* 168:130, 2011.
64. Benckekroun G, de Fornel-Thibaud P, Rodriguez et al. Ultrasonography criteria for differentiating ACTH dependency from ACTH independency in 47 dogs with hyperadrenocorticism and equivocal adrenal asymmetry. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24:1077-1085, 2010.
65. Besso JG, Penninck DG, Gliatto JM. Retrospective ultrasonographic evaluation of adrenal lesions in 26 dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 38:448-455, 1997.
66. Grooters AM, Biller DS, Theisen SK et al. Ultrasonographic characteristics of the adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: comparison with normal dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10:110-115, 1996.
67. Auriemma E, Barthez PY, Van der Vlugt-Meijer RH et al. Computed tomography and low resonance imaging of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 11 cases (2001-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 235:409-414, 2009.
68. Van der Vlugt-MeijerRH, Meij BP, van den Ingh TSGAM et al. Dynamic computed tomography of the pituitary gland in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17:773-780, 2003.
69. Meij B, Voorhout G, Rijnberk A. Progress in transsphenoidal hypophysectomy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs and cats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197:89-96, 2002.
70. Pisoni L, Del Magno, Lotti D et al. Ipofisectomia transfenoidale in un cane con ipercortisolismo e sintomi neurologici secondari a macroadenoma ipofisario. *Veterinaria* 26:25-35, 2012.