



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Veterinarias

**“NEFROPATÍA ASOCIADA A LA
ENFERMEDAD DE CUSHING EN EL CANINO:
ESTUDIO DE VARIABLES DE VALOR
PREDICTIVO DE DAÑO RENAL”**

Vet. Patricia Noemí Vidal

Director: Prof. Dr. Víctor Alejandro Castillo

Unidad de Endocrinología – Hospital Escuela de la Facultad de
Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires

2018

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) porque a través de una Beca pude realizar esta Tesis.

A la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Veterinarias por el apoyo financiero otorgado en los proyectos que permitió la compra de reactivos.

Al Hospital Escuela de la Facultad de Cs. Veterinarias y a su Laboratorio que me abrieron sus puertas para transformarse en mi lugar de trabajo.

A mi director, Víctor, que me permitió trabajar con él y formar parte de su equipo de trabajo en el Servicio de Endocrinología del Hospital Escuela. Gracias por la guía en el ámbito de la investigación y la clínica endocrinológica. Por el apoyo y la confianza.

Al grupo de trabajo ser Servicio de Endocrinología, en especial a Diego, Elber, Fer Bosetti, Fer Cabrera Blatter, Fer Hernández y Carolina Vecino, por el apoyo y compañía continua tanto en el trabajo diario como en lo personal. Almuerzos compartidos, salidas, charlas, cursos.

A la gente de caniles, Silvana y Cristian, por su amabilidad y colaboración.

A los propietarios que depositaron su confianza colaborando con sus perros haciéndolos partícipes de esta tesis, para lograr mejoras en la calidad de vida de futuros pacientes.

A mis padres y hermano, gracias por el apoyo, soporte y consejos.

A mi compañero de vida, Ernesto, gracias por la compañía, por la paciencia, la ayuda, el apoyo y el amor incondicional.

Contenido

Índice de figuras	6
1. RESUMEN.....	8
2. ABSTRACT	10
3. ABREVIATURAS	12
4. INTRODUCCIÓN.....	14
4.1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal	14
4.2. Hipotálamo	14
4.2.1.Embriología.....	14
4.2.2.Anatomía	16
4.2.3.Histología.....	17
4.2.4.Fisiología	18
4.3. Hipófisis.....	21
4.3.1.Embriología.....	21
4.3.2.Anatomía	24
4.3.3.Histología.....	26
4.3.4.Fisiología	29
4.4. Glándulas Adrenales	31
4.4.1.Embriología.....	31
4.4.2.Anatomía	31
4.4.3.Histología.....	32
4.4.4.Fisiología	34
4.5. Síndrome de Cushing.....	38
4.5.1.Generalidades	38
4.5.2.Síndrome de Cushing ACTH-dependiente	38
4.5.3.Síndrome de Cushing ACTH-independiente	41
4.5.4.Aspectos clínicos del Síndrome de Cushing	42
4.5.5.Diagnóstico del Síndrome de Cushing	44
4.6. Alteraciones metabólicas del Síndrome de Cushing y comorbilidades asociadas	

4.6.1. Síndrome de Cushing e Hipertensión	45
4.6.2. Síndrome de Cushing y Enfermedad Renal	50
4.6.3. Síndrome de Cushing e Hipercoagulabilidad	51
5. HIPÓTESIS	55
5.1. Principal:	55
5.2. Secundaria:	55
6. OBJETIVOS	55
7. MATERIALES y MÉTODOS	57
7.1. Experiencia 1: “ <i>Relación entre presión arterial y parámetros renales, NO y cortisol</i> ”	57
7.2. Experiencia 2: “ <i>Terapia renoprotectora e hipotensora</i> ”	61
7.3. Experiencia 3: “ <i>Estudio del estado de hipercoagulabilidad en perros con EC</i> ”. 64	
7.4. Experiencia 4: “ <i>Evaluación de niveles de Angiotensina II y Aldosterona</i> ”	66
8. RESULTADOS	69
8.1. Resultados de la Experiencia 1	69
8.1.1. <i>Presión Arterial e índice de resistencia de la arteria renal:</i>	69
8.1.2. <i>Radio-renograma excretor:</i>	70
8.1.3. <i>Estudio bioquímicos en suero:</i>	71
8.1.4. <i>Orina:</i>	71
8.2. Resultados de la Experiencia 2	78
8.2.1. <i>Efecto renoprotector:</i>	78
8.2.2. <i>Efecto Hipotensor:</i>	80
8.3. Resultados de la Experiencia 3	82
8.3.1. <i>Actividad de AT III y DD:</i>	82
8.3.2. <i>PAI-1, FvW y NO:</i>	85
8.4. Resultados de la Experiencia 4	87
8.4.1. <i>Aldosterona:</i>	87
8.4.2. <i>Angiotensina II:</i>	88
9. DISCUSION.....	91
9.1. <i>Discusión resultados de Experiencia 1:</i>	92

9.2. <i>Discusión resultados de Experiencia 2:</i>	97
9.3. <i>Discusión resultados de Experiencia 3:</i>	102
9.4. <i>Discusión resultados de Experiencia 4:</i>	108
10. CONCLUSIÓN:	114
11. BIBLIOGRAFÍA:	116
12. ANEXO - “Trabajos y publicaciones que se desprenden de esta Tesis y grupo de trabajo”	142
13.1. <i>Trabajos que se desprenden directamente de la Tesis:</i>	142
13.2. <i>Participación en otros trabajos durante el desarrollo de la tesis con el grupo de trabajo:</i>	143

Índice de figuras

Fig. 1. Esquema del desarrollo embriológico del Sistema Nervioso Central.....	15
Fig. 2. Distribución de los núcleos hipotalámicos.....	17
Fig. 3. Esquema de la proyección de las neuronas de los núcleos hipotalámicos.....	18
Fig. 4. Desarrollo embriológico de la hipófisis: proceso de formación.....	21
Fig. 5. Desarrollo embriológico de la hipófisis.....	23
Fig. 6. Desarrollo de la hipófisis y vascularización en el perro.....	24
Fig. 7. Ubicación anatómica de la hipófisis.....	25
Fig. 8. Esquema de la hipófisis.....	26
Fig. 9. Corte histológico de hipófisis de perro.....	27
Fig. 10. Procesamiento de la POMC.....	30
Fig. 11. Ubicación anatómica de las glándulas adrenales (esquema).....	32
Fig. 12. Corte histológico de glándula adrenal de perro.....	33
Fig. 13. Esquema de la autonomía de la glándula adrenal en la síntesis de cortisol... 35	
Fig. 14. Estereoidogénesis en corteza adrenal a partir de colesterol.....	36
Fig. 15. Esquema del eje HHA y sus regulaciones fisiológicas (simplificado).....	37
Fig. 16. Resonancia magnética nuclear (RMN) de región selar.....	39
Fig. 17. Macroadenoma hipofisario de perros con EC (necropsia).....	40
Fig. 18. Aspecto clínico de un perro con SC – Jack Russell, 4 años de edad.....	43
Fig. 19. Aspecto clínico clásico de un perro con SC – caniche, 12 años.....	43
Fig. 20. Tromboémbolo en Arteria Aorta distal en perro con EC.....	52
Fig. 21. TEP en perro con EC - imagen de necropsia.....	52
Fig. 22. PS y PD en perros controles y con EC.....	69
Fig. 23. Radio-renograma excretor y Centellografía en cámara gamma en dos perros con EC.....	70
Fig. 24. Tasa de filtración glomerular total (GFT) y tiempo de reactividad (RT) en perros con EC.....	71
Fig. 25. Concentraciones de cortisol plasmático y NO <i>nit/nit</i> en los perros control y con EC.....	73
Fig. 26. Correlación entre el NO <i>nit/nit</i> y el cortisol plasmático.....	74
Fig. 27. Correlación entre las PS y PD con el cortisol plasmático (A) y el NO <i>nit/nit</i> (B).	75
Fig. 28. Correlación entre la UPC (A) y GFT (B) con la PD.....	76
Fig. 29. Correlación entre el IR vs. cortisol plasmático (A) y el NO <i>nit/nit</i> (B).	77
Fig. 30. Delta UPC entre los grupo A (enalapril) y grupo B (doxazosina).....	78
Fig. 31. Delta UPC entre grupos A(a) y B(b) vs D.....	79

Fig. 32. Delta UPC entre grupo B vs E.....	80
Fig. 33. Delta PS entre Grupos A, B, C, D y E.	81
Fig. 34. Delta PD entre grupos A, B, C, D y E.....	82
Fig. 35. Asociación entre DD y AT III.	83
Fig. 36. Asociación entre AT III y UPC.....	84
Fig. 37. Asociación entre UPC y DD.	84
Fig. 38. Concentración de FvW entre testigos y cushing (EC).	85
Fig. 39. Concentración de PAI-1 entre testigos y cushing (EC).....	86
Fig. 40. Concentración de NO entre testigos y cushing (EC).	86
Fig. 41. Correlación entre PAI-1, FvW y NO.	87
Fig. 42. Concentración de aldosterona en testigos vs cushing (EC).....	88
Fig. 43. Concentración de Ang II en testigos vs cushing (EC).....	88

1. RESUMEN

La Enfermedad de Cushing (EC) se caracteriza por un estado de hipercortisolismo crónico, que provoca alteraciones metabólicas y sistémicas. Está asociada a gran cantidad de comorbilidades entre ellas la hipertensión arterial, de alta prevalencia, que conduce, junto con el hipercortisolismo, a la enfermedad renal, y ambas tienen repercusión en parámetros de coagulación, induciendo un estado de hipercoagulabilidad con riesgo de trombosis.

Para el estudio de estas comorbilidades se evaluaron perros con EC, evidenciándose disminución del óxido nítrico (NO) correlacionado con el aumento del cortisol ($r = -0.67$; $P < 0.0001$), asociados al aumento de presión arterial [PS y cortisol ($r = 0.46$; $P = 0.008$) PS y NO ($r = -0.87$; $P < 0.0001$)], con predominio de la presión diastólica (PD). PD correlacionó con cortisol ($r = 0.63$; $P < 0.0001$) de forma positiva y con el NO ($r = -0.81$; $P < 0.0001$) de forma inversa. Repercutiendo la PD, en parámetros renales afectándose la tasa de filtrado glomerular (GFT) ($r = -0.58$; $P = 0.007$) y aumentando la proteinuria, evidenciada por el aumento en la relación proteína/creatinina en orina (UPC) ($r = 0.8$; $P < 0.001$). UPC es un indicador de daño glomerular temprano. La utilización del Índice de resistencia (IR), relacionado al UPC y la presión arterial, posee gran valor pronóstico de afección renal. Para el posterior empleo de la terapia renoprotectora e hipotensora más efectiva, se realizó la comparación entre 2 grandes grupos de perros con EC según valor de UPC, a su vez subdivididos según presión arterial. Se comparó Enalapril vs Doxazosina entre los distintos grupos, siendo más efectiva la Doxazosina en reducir UPC (* P -valor_{BvsE} = 0,01) y presión arterial (PS: P -valor_{BvsE} = 0,01 y P -valor_{BvsE} = 0,027; PD P -valor_{BvsE} = 0,002).

Se pudo comprobar el estado de hipercoagulabilidad en perros con EC, a través de su comparación con un grupo control (perros sanos), encontrándose las concentraciones de Factor de von-Willebrand (FvW) y el Inhibidor del Activador de Plasminogeno-1 (PAI-1) elevadas (P -valor=0,003 y P -valor=0,002 respectivamente), y disminuida la actividad de Antitrombina III (ATIII), la cual se asoció al aumento de UPC ($r = -0,75$; P -valor $< 0,001$) y presencia de Dímero-D + (DD) ($r = -0,5$; P -valor=0,008), habiendo correlación en ambos casos. Resultados de gran utilidad para su posterior utilización como indicadores tempranos de riesgo de trombosis o Tromboembolismo pulmonar (TEP), asociados a sintomatología clínica e imágenes confirmatorias, para posterior terapia profiláctica.

Se evaluaron las concentraciones de aldosterona y Angiotensina II (Ang II) en perros con EC comparándola con perros sanos, para explicar parte de los mecanismos involucrados en el desarrollo de hipertensión. Los resultados arrojaron que la aldosterona no estaría involucrada, ya que su concentración fue la misma en controles sanos que perros con EC (P-valor= 0,8), no así la Ang II que se la encontró aumentada en los perros cushing (P-valor< 0,001).

Los datos aportados en esta tesis son de gran relevancia para ampliar el conocimiento en la fisiopatología de esta enfermedad y mejorar el diagnóstico precoz de estas comorbilidades e implementar terapias preventiva adecuada en la clínica diaria que mejorarán la calidad y sobrevida del paciente.

Palabras clave: Enfermedad de Cushing – Nefropatía – Hipertensión – Hipercoagulabilidad

2. ABSTRACT

Cushing's disease (CD) is characterized by chronic hypercortisolism, which cause metabolic and systemic alterations. It is associated to a lot of comorbidities, hypertension is one of them, which leads along with hypercortisolism, to kidney disease, and both have an impact on coagulation parameters which develops in an hypercoagulability state with thrombosis risk.

Taken all this to account, CD's dogs were studied. The results showed an important decrease in nitric oxide (NO) correlated with the increase in cortisol ($r = -0.67$, $P < 0.0001$), and both were associated with an increase in blood pressure [(PS and cortisol ($r = 0.46$, $P = 0.008$) PS and NO ($r = -0.87$; $P < 0.0001$)], specially with diastolic pressure (PD). PD correlated with cortisol ($r = 0.63$, $P < 0.0001$) positively and with NO ($r = -0.81$; $P < 0.0001$). All this has an impact in renal parameters affecting the glomerular filtration rate (GFT) ($r = -0.58$, $P = 0.007$) and increasing proteinuria, evidenced by the increase in protein/creatinine ratio in urine (UPC) ($r = 0.8$, $P < 0.001$), which is an indicator of early glomerular damage. Using Resistance Index (IR) related to the UPC and blood pressure have a high prognostic value of renal affection. To decided what treatment is the most effective renoprotective and hypotensive therapy, a comparison was made between 2 groups of CD's dogs according to the UPC value, they were also subdivided according to arterial pressure. Enalapril vs Doxazosina were compared. The comparison was made between all the groups. Doxazosine was the most effective in reducing UPC (* P -valor_{BvsE} = 0,01) and blood pressure (PS: P -valor_{BvsE} = 0,01 and P -valor_{BvsE} = 0,027; PD P -valor_{BvsE} = 0,002).

The hypercoagulability state in CD's dogs was confirmed, a comparison between a control group (healthy dogs) and cushing's dogs was made, it was found in cushing's dogs a high concentrations of von-Willebrand Factor (FvW) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (P -value = 0.003 and P -value = 0.002 respectively), and a decreased in activity of Antithrombin III (ATIII), which was associated with an increase of UPC ($r = -0.75$, P -value < 0.001) and presence of D-Dimer + (DD) ($r = -0.5$, P -value = 0.008), having a correlation in both cases. Those results have a great utility as early indicators of thrombosis risk or pulmonary thromboembolism (TEP). Indicators associated with clinical symptoms and a positive lung thrombosis image are needed to confirm the TEP.

To explain one of the mechanisms involved in the development of hypertension, the concentrations of aldosterone and Angiotensin II (Ang II) in CD's dogs were compared with a group of healthy dogs. The results showed that aldosterone would not be involved, because the concentration was the same in healthy controls as CD's dogs (P-value= 0,8), but Ang II was found increased in Cushing's dogs (P-value < 0,001), which means that it has a role in Cushing's hypertension.

The results of this research thesis has a great relevance to expand the knowledge in the pathophysiology of this disease. It will help to improve the early diagnosis of these comorbidities and to implement appropriate preventive therapies in the daily clinic which will improve the quality life and survival of the patient.

Keywords: Cushing's disease – Nephropathy – Hypertension – Hypercoagulability

3. ABREVIATURAS

α -MSH: Hormona estimulante de melanocitos o melanotrofina

11 β -HSD 2: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2

ACTH: Adrenocorticotrofina

ADH: Hormona antidiurética

Ang: Angiotensina/ Ang II: Angiotensina II

ATIII: Antitrombina III

AT1 - AT2: Receptores de angiotensina

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

DD: Dímero-D

EC: Enfermedad de Cushing

ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina

eNOS: Oxido Nítrico sintetasa endotelial

FSH: Hormona Folículoestimulante

FvW: Factor de von-Willebrand

GFT: Tasa de Filtrado Glomerular

GR: Receptores de glucocorticoides

HAD: Hiperkortisolismo Adrenal Dependiente

HHA: Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

HPD: Hiperkortisolismo Pituitario Dependiente

IECA: Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina

IR: Índice de Resistencia

IRC: Insuficiencia Renal Crónica

LH: Hormona Luteinizante

MR: Receptores de mineralocorticoides

NO: Oxido Nítrico

PAI-1: Inhibidor del Activador de Plasminogeno-1

PD: Presión Diastólica

PS: Presión Sistólica

POMC: Proopiomelanocortina

PVN: Paraventricular

RCC: Relación Cortisol/Creatinina en orina

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RT: Tiempo de Reactividad

SC: Síndrome de Cushing

SO: Núcleo Supraóptico

SRA-A: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

TAC: Tomografía Axial Computada

TEP: Tromboembolismo pulmonar

TRH: Hormona liberadora de tirotrófina

TSH: Hormona Tirotrófina

UPC: Relación Proteína /Creatinina en orina

INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

El eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) está formado por un conjunto de complejas interacciones entre hipotálamo, hipófisis y corteza adrenal, quien finalmente está encargada de mediar la respuesta frente a estímulos estresores con la síntesis y secreción de glucocorticoides. Los componentes anatómicos principales del eje son: el hipotálamo, la hipófisis y la corteza adrenal, aunque también se puede incluir al hipocampo (Xiong & Zhang, 2013). Todas estas estructuras se integran en un sistema perfecta y altamente regulado, interdependiente, que mantiene la homeostasis del organismo. En respuesta al estrés, el núcleo paraventricular (PVN) libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona antidiurética (ADH), que entran en la circulación portal hipofisaria y estimulan la síntesis y secreción de adrenocorticotrofina (ACTH) en la circulación periférica. La ACTH es producida a partir de la escisión de la molécula precursora: proopiomelanocortina (POMC) en las células corticotropas de la *pars distalis* o *lóbulo anterior* de la hipófisis. Una vez liberada, la ACTH actúa en la corteza adrenal estimulando la síntesis y secreción de glucocorticoides: cortisol en los perros, seres humanos, ovejas y conejillos de indias, y corticosterona en roedores (Papadimitriou & Priftis, 2009).

El eje HHA se encuentra constituido por tres tejidos que presentan características propias embriológicas, anatómicas, histológicas y fisiológicas (Panagiotakopoulos & Neigh, 2014).

4.2. Hipotálamo

4.2.1. Embriología

En el proceso de gastrulación se establecen las tres capas germinales en el embrión que son: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo. El ectodermo que está ubicado sobre la notocorda (cordón formado por células prenotocordales derivadas del epiblasto) forma la placa neural; llamándose de esta forma, neuroectodermo. Los bordes de la placa neural se elevan y pliegan hasta fusionarse, formando el tubo neural (Sadler, 2005).

A partir del extremo cefálico del tubo neural, se forman tres vesículas cerebrales primarias que son: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Luego el prosencéfalo a su vez se subdivide en telencéfalo y diencefalo, y el rombencéfalo también se subdivide en metencéfalo y mielencéfalo, el mesencéfalo continuo como mesencéfalo.

El diencefalo consiste en una placa que proviene del techo más dos placas alares, no posee placas del piso ni basales. Desde la placa del techo se forma la epífisis; y gracias a una hendidura, se divide a las placas alares en una porción dorsal, que será el tálamo; y una porción ventral, que será el hipotálamo (Altman & Bayer, 1978).

El hipotálamo se irá diferenciando en distintos grupos neuronales que funcionarán como centros regulatorios para las diferentes funciones del organismo. Del mismo modo lo irán haciendo las otras partes (telencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo). (Fig. 1)

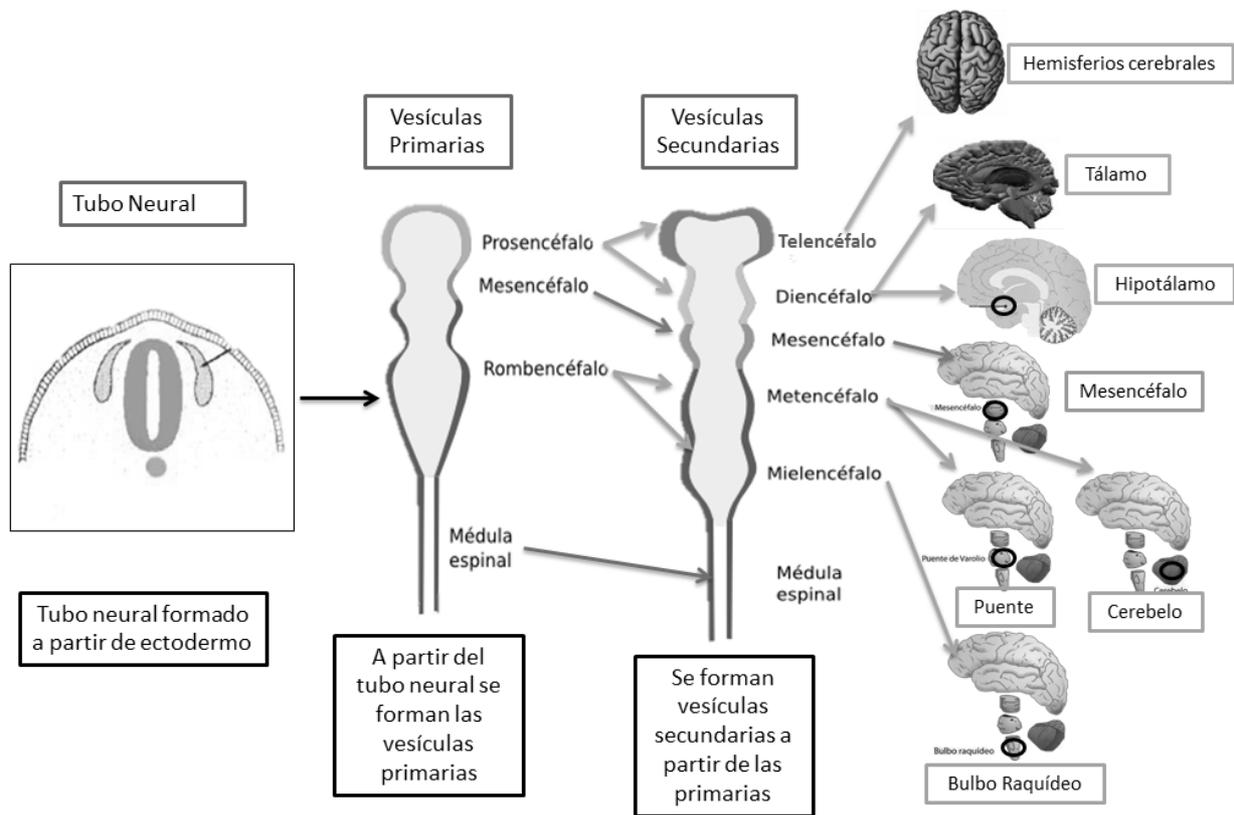


Fig. 1. Esquema del desarrollo embriológico del Sistema Nervioso Central.

4.2.2. Anatomía

En mamíferos, el hipotálamo se ubica debajo del tálamo y forma las paredes laterales y el piso del tercer ventrículo. Está limitado por delante o en dirección rostral por el quiasma óptico, en ambos lados por las cintillas ópticas y hacia caudal, por los cuerpos mamilares (Fig. 2). Se describen cuatro regiones rostro-caudales: preóptica, anterior o supraóptica, tuberal y mamilar. En la región preóptica se encuentra el núcleo preóptico, en la anterior o supraóptica se encuentran los núcleos supraóptico (SO) y PVN, y el área hipotalámica anterior, en la tuberal se encuentran los núcleos arcuato, tuberal, dorsomedial y ventromedial, y Mamilar se encuentran los núcleos hipotalámico posterior y mamilar; y también tres regiones medio-laterales: periventricular, medial y lateral. En la región periventricular se encuentran los núcleos PVN, arcuato, supraquiasmático y periventricular; la región medial se encuentran los núcleos preóptico medial, hipotalámico anterior, dorsomedial, ventromedial y mamilar. Por último, la región lateral está constituida por el área preóptica y el área hipotalámica lateral (Netter, 2010; Szarek, Cheah, Schwartz, & Thomas, 2010).

A la zona que forma el piso del tercer ventrículo se la llama eminencia media, y forma la interfase anatómica entre las vías nerviosas centrales y la hipófisis. La eminencia media es una franja de tejido que se extiende hacia abajo, hacia la *pars tuberalis* de la adenohipófisis y se comunica con la neurohipófisis a través del tallo infundibular (Kobayashi, Yamaguichi, & Uemura, 1999).

El hipotálamo está formado por una matriz difusa de células que constituyen la sustancia gris central, donde se encuentran masas nucleares más o menos diferenciadas, denominadas núcleos o áreas hipotalámicas.

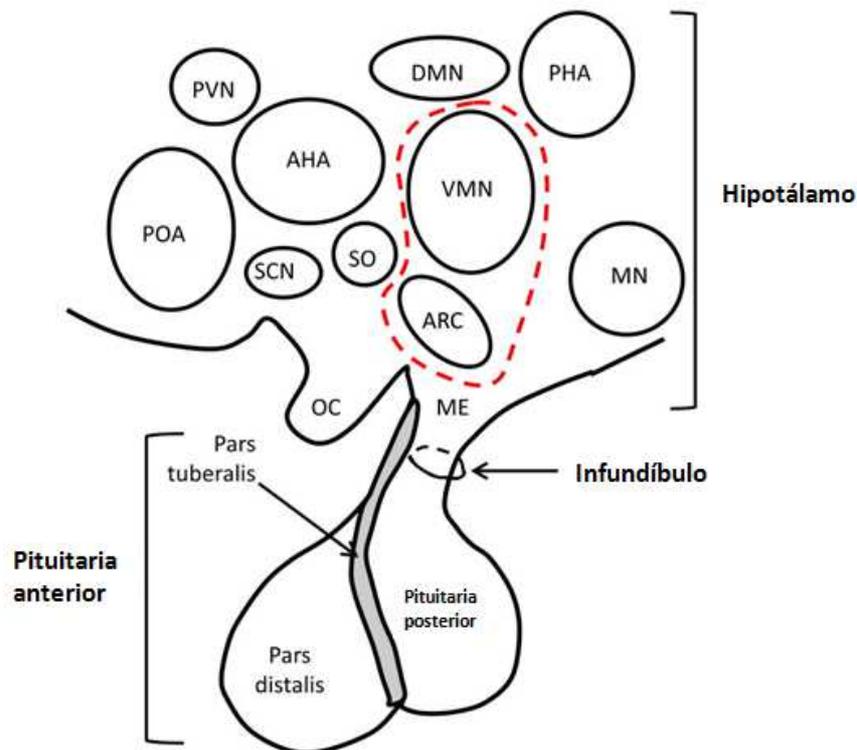


Fig. 2. Distribución de los núcleos hipotalámicos.

AHA: área hipotalámica anterior; ARC: núcleo arcuato; DMN: núcleo dorsomedial; ME: eminencia media; MN: núcleo mamilar; OC: quiasma óptico; POA: área preóptica; PHA: área hipotalámica posterior; PVN: núcleo paraventricular; SCN: núcleo supraquiasmático; SO: núcleo supraóptico; VMN: núcleo ventromedial (Schwartz & Andrews, 2013).

4.2.3. Histología

Como se mencionó en el apartado anterior, el hipotálamo contiene los núcleos hipotalámicos; los cuales se encuentran formados por neuronas. La comunicación entre estos núcleos y la hipófisis se produce a través el tallo hipofisario. Los núcleos PVN y SO están formados por neuronas magnocelulares que proyectan sus axones hacia la neurohipófisis liberando oxitocina y ADH o vasopresina (Swanson & Sawchenko, 1983). Estos tienen redes capilares muy extensas y las neuronas que los forman se denominan “neuronas neurosecretoras”. Unas neuronas de menor tamaño que las magnocelulares y otros núcleos hipotalámicos, las neuronas parvocelulares, regulan la secreción de las hormonas hipofisarias, a través de la liberación “factores de liberación o inhibición” en la zona de la eminencia media, contiguo a la red capilar primaria del sistema porta hipofisario (Yeung, Chan, Leung, & Cheng, 2006) (Fig. 3).

La CRH, que estimula la secreción de ACTH en las células corticotrofas de la hipófisis (ver sección “Fisiología”), es producida en el núcleo PVN. Este núcleo, además de estar formado por neuronas parvocelulares y magnocelulares neurosecretoras, contiene neuronas de larga proyección que comunica con regiones del cerebro posterior y médula espinal (Handa & Weiser, 2014).

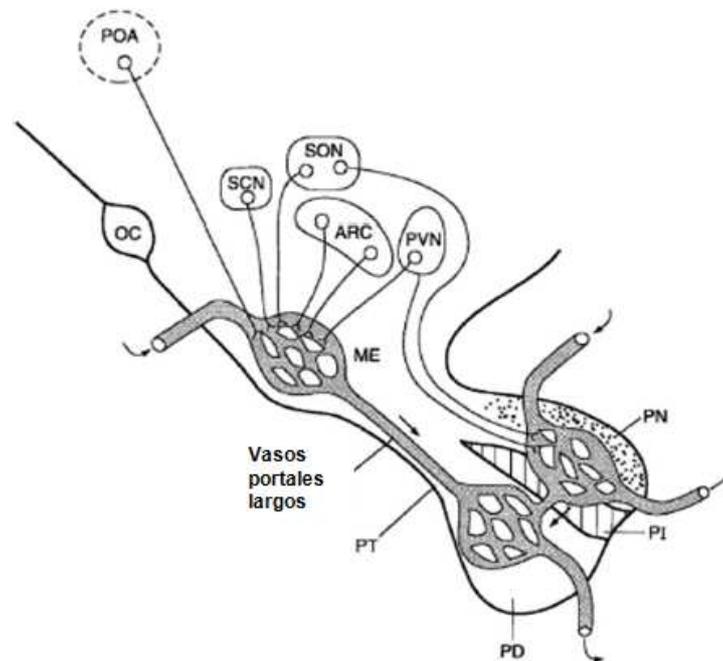


Fig. 3. Esquema de la proyección de las neuronas de los núcleos hipotalámicos.

(PVN: paraventricular, SON: supraóptico, ARC: arcuato, SCN: supraquiasmático, POA: área preóptica) Hacia a la eminencia media (ME), donde comunican con los vasos del sistema porta-hipofisario y hacia la *pars nervosa* (PN). OC: quiasma óptico, PT: *pars tuberalis*, PD: *pars distalis*, PI: *pars intermedia* (Norris, 2007).

4.2.4. Fisiología

En los núcleos SO y PVN las neuronas magnocelulares producen oxitocina y ADH (Szarek et al., 2010). Estas hormonas se unen a proteínas transportadoras, llamadas neurofisinas, para ser transportadas en gránulos electrodensos a través de los axones del haz hipotálamo-hipofisario hacia la neurohipófisis (o lóbulo posterior). A partir del sistema de vasos sanguíneos de la neurohipófisis, estas hormonas son secretadas al torrente sanguíneo hacia la circulación sistémica (Norris, 2007). Las funciones principales de la oxitocina son, por un lado, estimular las contracciones uterinas durante el parto, e intervenir en procesos de secreción de la leche durante la lactancia.

La misma se secreta en respuesta a la succión del pezón o la distensión del cuello uterino durante el parto.

La ADH, en cambio, tiene distintas funciones según el tipo de receptor al que se una, ya sea, estimulando la vasoconstricción arteriolar o actuando a nivel renal, favoreciendo la reabsorción de líquido. Esta hormona se secreta en respuesta al aumento de la osmolaridad plasmática o a la disminución marcada de la volemia (mayor al 10%), es decir ante una hipovolemia (Ring, 2005).

Las neuronas parvocelulares de los núcleos mencionados y de los otros núcleos hipotalámicos sintetizan las “hormonas liberadoras o inhibidoras” de las hormonas adenohipofisarias (Szarek et al., 2010). A partir de los somas o cuerpos neuronales, estas hormonas son transportadas a través de los axones hacia la eminencia media, donde son liberadas, ingresando al sistema porta hipofisario. Entre ellas se encuentran: la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), la hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (GHIH) o somatostatina, la CRH, la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y la amina inhibidora de prolactina (dopamina) (Pérez Castro, Renner, Haedo, Stalla, & Arzt, 2012; Scanes, Jeftinija, Glavaski-Joksimovic, A. Proudman, Arámburo, & Anderson, 2005).

El hipotálamo actúa no sólo regulando funciones endócrinas sino que también funciona como un gran centro integrador, recibiendo estímulos sensoriales y de todo tipo provenientes del ambiente externo (por ejemplo luz, temperatura, estímulos visuales y auditivos, estímulos estresores, etc.) y también información sobre el medio interno (por ejemplo, la presión arterial, la osmolaridad, PH, citoquinas e interleuquinas etc.) generando respuestas autónomas.

Se detallará el funcionamiento del núcleo PVN para comprender la fisiología del eje HHA.

El núcleo PVN se encarga de recibir e integrar la información relacionada al stress, proveniente de distintas fuentes. En respuesta a esos estímulos, la CRH es la hormona que se libera y por ende inicia la respuesta del eje HHA frente a estos estímulos estresores; estimulando a su vez al área corticotropa de la hipófisis (ubicada en la adenohipofisis) para secretar ACTH (Bousquet, Ray, & Melmed, 1997). Los efectos de la CRH en la hipófisis son mediados por los receptores de tipo 1 (CRH-R1) que es el receptor de CRH mas importante (R. Chen, Lewis, Perrin, & Vale, 1993). La cantidad de receptores disponibles en la hipófisis puede verse modificado en condiciones fisiológicas, generando variaciones en la respuesta de dicha glándula frente al estímulo de la CRH (por ejemplo, la CRH misma y la ADH, entre otros, disminuyen la expresión de estos receptores) (Panagiotakopoulos & Neigh, 2014).

El núcleo PVN, también sintetiza ADH, la cual funciona como un coregulador y junto a la CRH estimula la síntesis y secreción de ACTH en la hipófisis, mediante su unión a receptores de tipo 3 (V3) (Aguilera, G., Rabadan-Diehl, 2000; Schlosser, Almeida, Patchev, Yassouridis, & Elands, 1994). El gen que codifica para la ADH, presenta elementos de respuesta para estradiol en su secuencia, el cual estimula la síntesis de dicha hormona, favoreciendo la activación del eje HHA (Shapiro, Xu, & Dorsa, 2000). También, la oxitocina, producida en este núcleo, estimula la secreción de ACTH (Handa & Weiser, 2014).

Las neuronas que producen CRH se encuentran conectadas a células adrenérgicas del núcleo del tracto solitario (Kitazawa, Shioda, & Nakai, 1987; Plotsky, Cunningham, & Widmaier, 1989). Los estímulos estresores aumentan la síntesis y liberación de noradrenalina en el PVN, favoreciendo la secreción de CRH y consecuentemente, de ACTH (Cole & Sawchenko, 2002; Pacak, 2000; Terrazzino, Perego, & De Simoni, 1995).

La serotonina también tiene un rol regulador importante sobre el núcleo PVN; expresándose distintos tipos de receptores para este neuropéptido en las neuronas parvocelulares. Según el tipo de receptor expresado, los efectos de la serotonina serán estimuladores o inhibidores del eje HHA (García-Iglesias, Mendoza-Garrido, M.E. Gutierrez-Ospina, Rangel-Barajas, Noyola-Diaz, & Terron, 2013; Heisler et al., 2007; Lee et al., 2008; Zhang et al., 2002). Además, el efecto de la serotonina sobre el PVN puede ser modificado por el estradiol (Rossi et al., 2010).

El núcleo PVN también está regulado, mediante sinapsis intermediarias, por el hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala y el septum (Herman et al., 2003).

Finalmente, el cortisol, la hormona efectora por excelencia del eje HHA, ejerce un efecto inhibitor sobre la secreción de CRH (feedback negativo) al unirse a sus receptores en el núcleo PVN (Herman & Cullinan, 1997), o en forma indirecta, mediante su acción en el hipocampo (Handa & Weiser, 2014).

En resumen, existen diversos factores o estímulos reguladores del eje HHA que ejercen su acción a nivel hipotalámico, pudiendo estimular o inhibir al eje, de forma directa o indirecta.

4.3. Hipófisis

4.3.1. Embriología

La hipófisis se desarrolla a través de partes distintas: por un lado, la bolsa de Rathke, que consiste en una evaginación del ectodermo del techo del estomodeo (cavidad oral primitiva); y por otro, el infundíbulo, que es una prolongación o evaginación del diencefalo que proviene del neuroectodermo (Gilbert, 2000). La bolsa de Rathke, crece hacia dorsal hasta perder su conexión con la cavidad bucal, quedando así en total contacto con el infundíbulo (Fig. 4). Las células que se encuentran en la pared anterior de la bolsa de Rathke proliferan y forman la adenohipófisis; paralelamente una prolongación de la misma crece a lo largo y alrededor del tallo del infundíbulo, rodeándolo, formando la *pars tuberalis* (Sasaki & Nishioka, 1998). La pared posterior de la bolsa de Rathke es la que da lugar a la *pars intermedia*. El infundíbulo da origen el tallo infundibular y la pars nervosa (neurohipófisis) (Fig. 4). La neurohipófisis queda formada por células de la glía y fibras nerviosas provenientes del hipotálamo. Debido a que el hipotálamo también tiene su origen en el diencefalo, el mismo junto con la hipófisis desarrollan una relación vascular y neural estrecha.

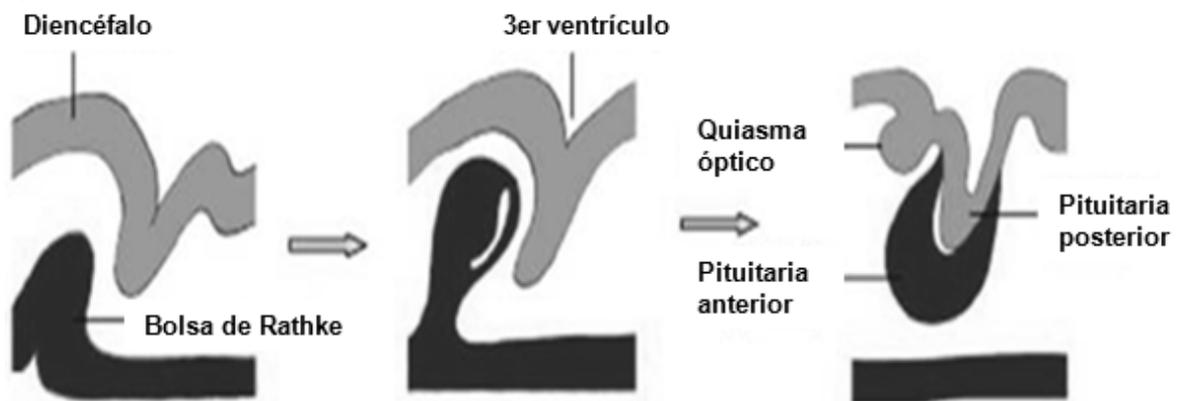


Fig. 4. Desarrollo embriológico de la hipófisis: proceso de formación.

(Yeung et al., 2006)

Recientemente se ha comunicado por algunos autores que la región glandular de la hipófisis se podría formar a partir de una placoda adenohipófisaria (células de la cresta neural) que se desprendería del neuroectodermo, migraría en sentido antero-posteriormente y finalmente se adheriría al extremo del infundíbulo (Kawamura, Kouki, Kawahara, & Kikuyama, 2002).

Para el desarrollo de los distintos tipos celulares que se encuentran en la hipófisis se necesita de la interacción de numerosos factores de transcripción y factores de crecimiento que se expresan tanto en la bolsa de Rathke como en la región ventral del diencéfalo (Pérez Castro et al., 2012). En el proceso de morfogénesis intervienen diversos factores como por ejemplo la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), que es necesaria para la invaginación de la bolsa de Rathke, y el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF-8), entre otros (Brinkmeier et al., 2009; Davis & Camper, 2007; Ericson, Norlin, Jessell, & Edlund, 1998; Takuma et al., 1998; Treier et al., 1998; Zhu, Gleiberman, & Rosenfeld, 2007). Los factores de transcripción y de crecimiento son esencial en el desarrollo de la hipófisis y en la síntesis de hormonas (Davis et al., 2010; Suh, Gage, Drouin, & Camper, 2002); por lo que defectos en los genes que los codifican pueden generar alteraciones en el desarrollo de la hipófisis y en su funcionamiento (Ellsworth, Butts, & Camper, 2008). El desarrollo de las células corticotropas de la adenohipófisis involucra la acción de factores de transcripción diferentes al resto de las líneas celulares hipofisarias (Melmed, 2003; Taniguchi, Yasutaka, Kominami, & Shinohara, 2002) (Fig. 5). Estas son el primer tipo celular hipofisario en completar su desarrollo. En el humano, por ejemplo, las células corticotropas pueden ser identificadas recién a partir de la sexta semana de vida intrauterina (Dubois & Hemming, 1991), mientras que en el perro se las puede identificar a partir del día 30 (Sasaki & Nishioka, 1998).

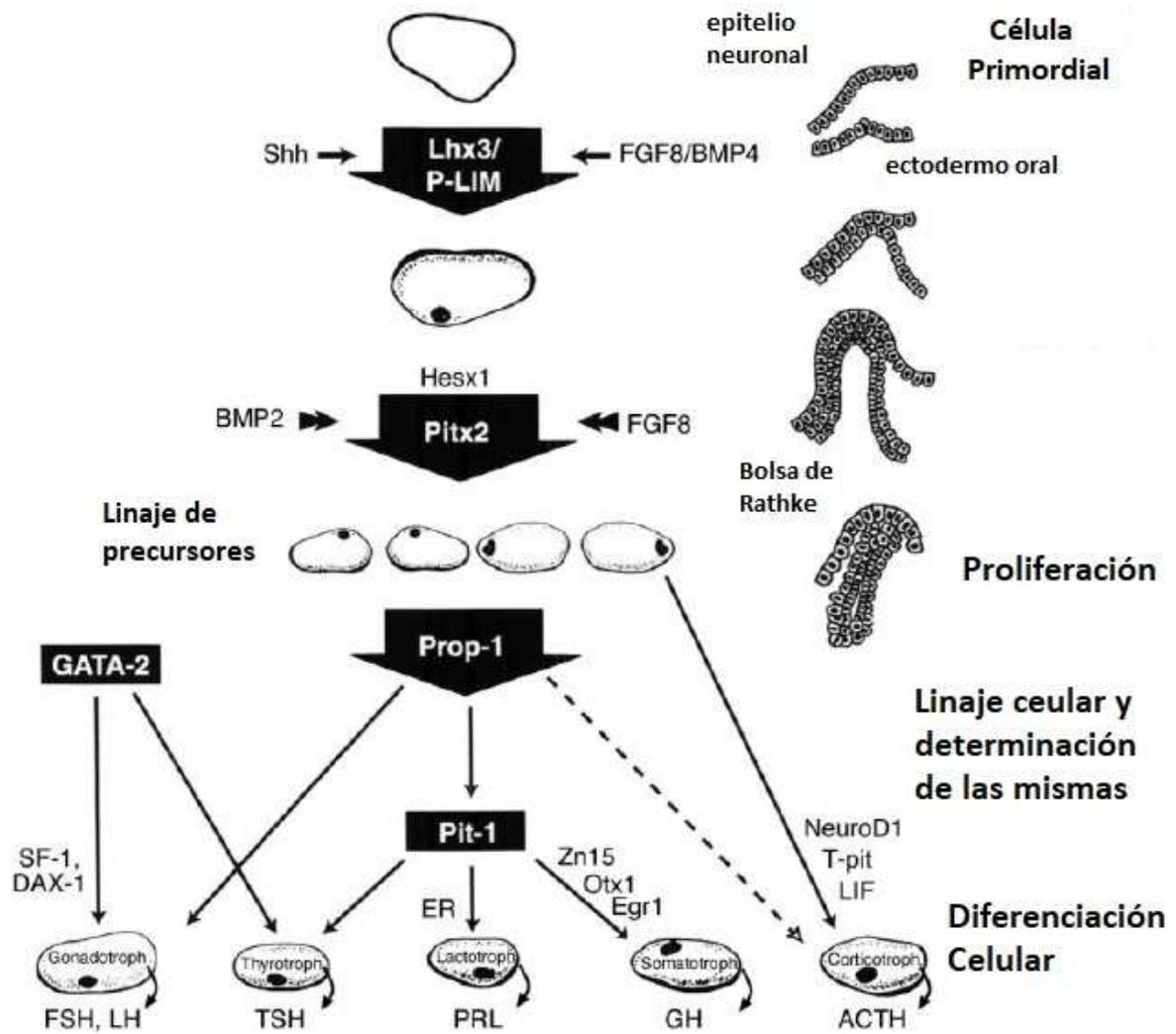


Fig. 5. Desarrollo embriológico de la hipófisis.

Desarrollo de cada línea celular a partir de la célula primordial (Melmed, 2003).

Al mismo tiempo que se produce el desarrollo celular, se produce el de la vascularización de la hipófisis y del sistema porta hipofisario (Mollard, Hodson, Lafont, Rizzoti, & Drouin, 2012; Sasaki & Nishioka, 1998) (Fig. 6). Una vez completada la organogénesis, la hipófisis finalmente queda diferenciada en adenohipófisis y neurohipófisis (ver sección anatomía).

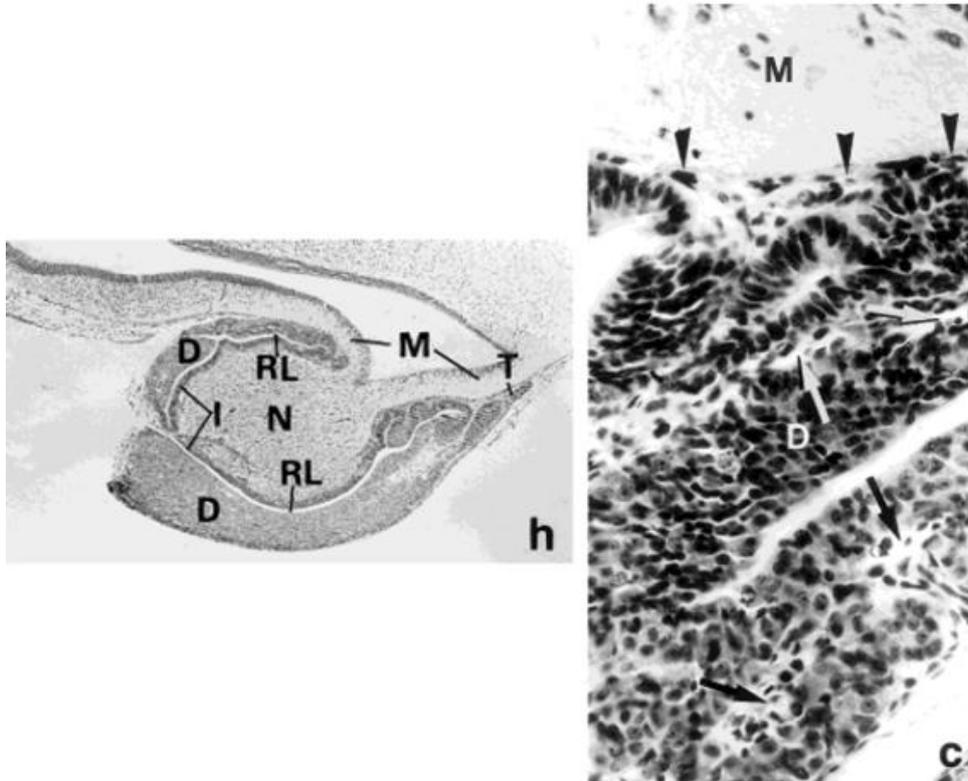


Fig. 6. Desarrollo de la hipófisis y vascularización en el perro.

En la imagen de la izquierda se observa un corte histológico de la hipófisis de un feto de 45 días, coloreado con hematoxilina/eosina, 30X. La bolsa de Rathke (RL) todavía persiste y los lóbulos hipofisarios se están organizando (D: *pars distalis*, I: *pars intermedia*, N: neurohipófisis, T: *pars tuberalis*, M: eminencia media). En la imagen de la derecha se observa a mayor aumento (300X) la vascularización de la hipófisis a los 38 días de vida fetal. Las cabezas de flecha muestran los vasos portales entre la eminencia media y *pars distalis*. Las flechas indican capilares sanguíneos en la *pars distalis* (Sasaki & Nishioka, 1998).

4.3.2. Anatomía

La hipófisis se encuentra ubicada en la “silla turca” que es una depresión central del cuerpo del hueso esfenoides. Su techo es una extensión de la duramadre llamado diafragma de la silla turca, que está atravesado por el tallo hipofisario.

Rostral a la hipófisis se puede encontrar el quiasma óptico (Fig. 7), y hacia dorsal el hipotálamo; al cual se conecta mediante el tallo hipofisario.

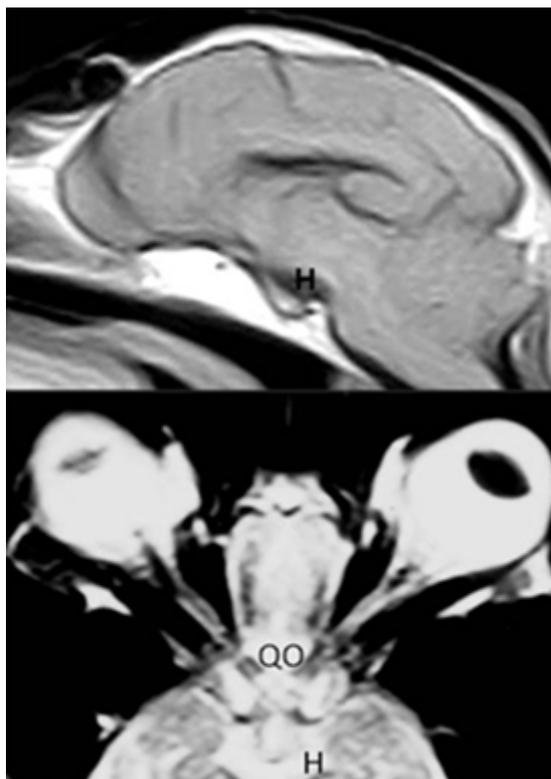


Fig. 7. Ubicación anatómica de la hipófisis.

Se ubica dentro de la fosa hipofisaria del hueso esfenoides o “silla turca”. Imagen correspondiente a una Resonancia Magnética Nuclear. H: hipófisis, QO: quiasma óptico (Van der Vlugt-Meijer, Voorhout, & Meij, 2002).

La hipófisis se la puede dividir, embriológicamente, en dos grandes partes: la adenohipófisis y la neurohipófisis (Fig. 8). La adenohipófisis, a su vez, está formada de tres partes: *pars distalis*, *pars intermedia* y *pars tuberalis* (Amar & Weiss, 2003; Page, 1994). La *pars intermedia* se encuentra presente en el perro, pero no en muchos otros mamíferos. La neurohipófisis, por otro lado, está formada por la *pars nervosa*, eminencia media y el tallo infundibular. La *pars tuberalis* de la adenohipófisis y el tallo infundibular de la neurohipófisis forman el llamado tallo hipofisario (Page, 1994).

La hipófisis tiene irrigación proveniente de las arterias hipofisarias que derivan de las arterias carótidas internas. En el tallo infundibular las arterias hipofisarias superiores forman una red capilar primaria. Esta confluye en varias venas porta, las cuales se conectan a una red capilar secundaria a nivel de la *pars distalis*, y finalmente drenan en las venas hipofisarias (Halasz, 1994) (Fig. 3).

En la neurohipófisis hay una la red capilar posterior, que también deriva de las arterias hipofisarias inferiores, en este caso, y drena en las venas correspondientes. Al mismo tiempo, la red capilar posterior se conecta con la red capilar secundaria de la *pars distalis*, (pudiéndose denominar sistema porta corto).

La *pars intermedia* de la adenohipófisis carece de una irrigación directa (Bosje, Rijnberk, Mol, Voorhout, & Kooistra, 2002; Holmes & Ball, 1974; Pérez Castro et al., 2012).

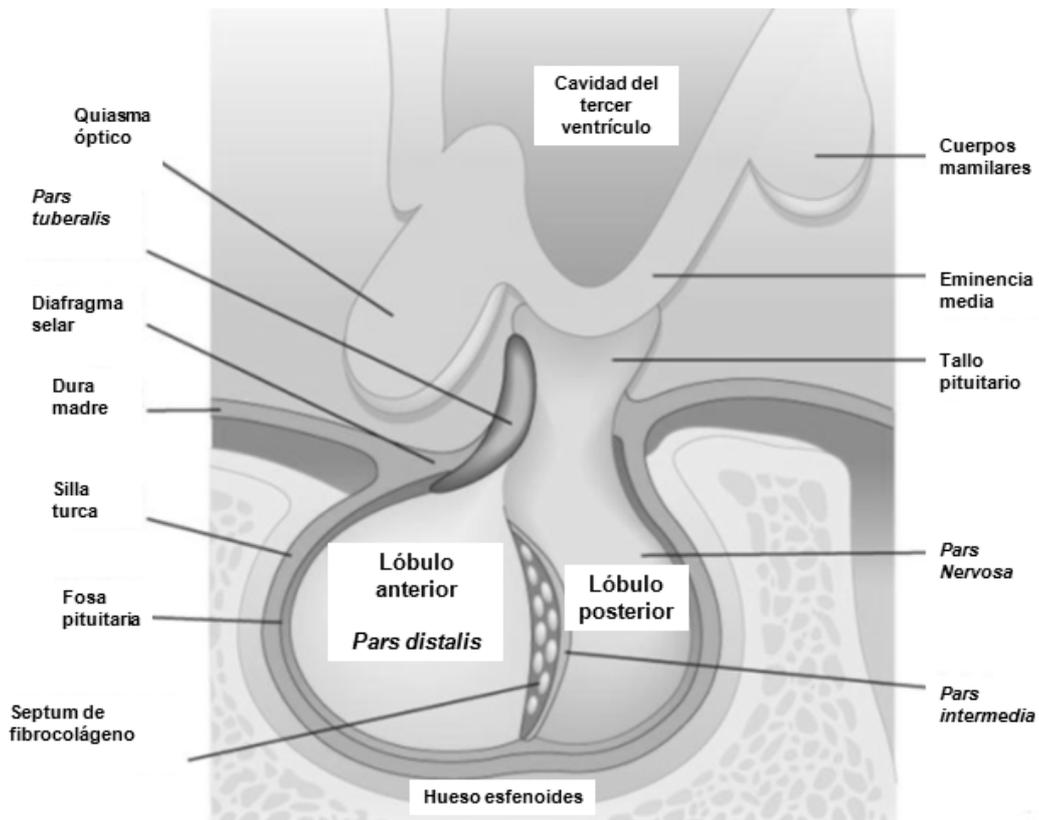


Fig. 8. Esquema de la hipófisis.

Se encuentra ubicada en la “silla turca” del hueso esfenoides. Se observa su relación con el hipotálamo a través el tallo pituitario y su organización en un lóbulo anterior y posterior (Koeppen & Stanton, 2010).

4.3.3. Histología

La *pars distalis* (Fig. 9) está formada por células glandulares organizadas en cordones o acúmulos, en contacto con una red de capilares fenestrados (Scanes et al., 2005). Hay escaso tejido conectivo, habiendo principalmente una red de fibras reticulares y células folículo-estrelladas que son de sostén epiteliales (Inoue, Couch, Takano, & Ogawa, 1999). Las células glandulares son clasificadas en cromófilas y cromófobas.

Las células cromófilas pueden a su vez subdividirse en acidófilas o también llamadas eosinófilas, que son las que se tiñen intensamente con eosina al utilizar la coloración de hematoxilina/eosina; y basófilas, las que se tiñen con hematoxilina (Norris, 2007). Con la coloración tricrómica de Mallory, el citoplasma se tiñe: en las células acidófilas de color rojo, y en las basófilas, de color azul. También, las células basófilas se tiñen con la coloración de Ácido periódico de Schiff (PAS) de forma muy intensa, ya que las hormonas que producen son glicoproteínas.

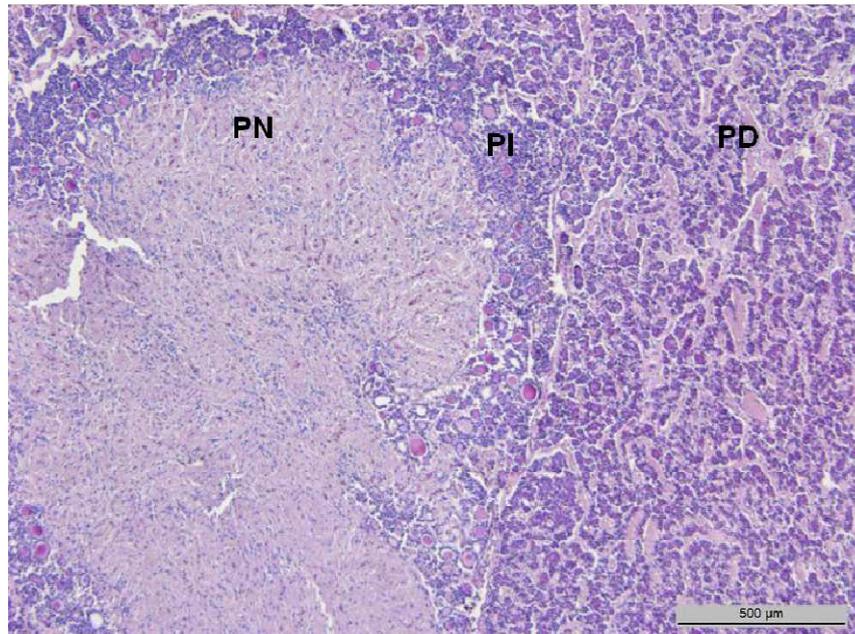


Fig. 9. Corte histológico de hipófisis de perro.

Tinción hematoxilina/eosina. Se observan la *pars nervosa* (PN), *pars intermedia* (PI) y *pars distalis* (PD) (Gallelli, 2015).

Dentro del grupo de las células acidófilas se ubican las células somatotropas (productoras de hormona de crecimiento) y lactotropas (productoras de prolactina); mientras que en el grupo de las basófilas se encuentran las tirotropas (células productoras de hormona tirotrófica [TSH]), las gonadotropas (células productoras de hormona folículoestimulante y luteinizante [FSH y LH]) y las corticotropas (células productoras de hormonas ACTH).

Las células cromófobas, son llamadas así debido a la falta de afinidad por los colorantes mencionados previamente. Son consideradas cromófobas a las células acidófilas o basófilas que se encuentran en un periodo de inactividad, luego haber liberado los gránulos que contienen hormonas.

En los mamíferos, la *pars tuberalis* está ubicada en ventral de la eminencia media y se continúa conteniendo a la *pars distalis* y *pars intermedia*; y se encuentra conectada con el tercer ventrículo a través de procesos citoplasmáticos de los tanicitos (Norris, 2007; Wittkowski, Bockmann, Kreutz, & Bockers, 1999). Está constituida por células específicas de la *pars tuberalis*, células foliculares y otras células similares a las de la *pars distalis*, rodeadas por tejido conectivo. Estas células se encuentran en contacto con los vasos del sistema porta-hipofisario y con terminales nerviosas de la eminencia media (Norris, 2007). Las células similares a las de la *pars distalis* están principalmente en la región distal de la *pars tuberalis*, pudiéndose identificar células gonadotropas y tirotropas. Las células foliculares son células de pequeña tamaño, dispuestas en grupos, son de tipo no secretor, mientras que las células específicas son células del tipo glandulares que difieren en las características ultraestructurales de otros tipos celulares de la adenohipófisis (Wittkowski et al., 1999). Se ha reportado que al menos uno de estos productos de estas células, si bien se desconoce su origen, estimularía la secreción de prolactina (Lafarque, Oliveros, & Aguado, 1998).

La *pars intermedia* está formada por una capa de cordones celulares, algunos de ellos invaden la *pars nervosa*. Las células presentes en esta región se denominan melanotropas y son similares a las corticotropas. Estas sintetizan la hormona melanocitoestimulante o melanotrofina alfa (α -MSH) a partir de su precursor POMC (ver la sección fisiología) y reciben terminales axonómicas del sistema dopaminérgico (Bosje et al., 2002; Pérez Castro et al., 2012).

La neurohipófisis está formada por células gliales (pituicitos), fibras nerviosas que son amielínicas, que provienen de neuronas secretoras del hipotálamo y una gran cantidad de capilares. Las fibras nerviosas forman el haz hipotálamo-hipofisario, constituido por los axones de las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular (Pérez Castro et al., 2012; Swanson & Sawchenko, 1983).

4.3.4. Fisiología

Como se mencionó en apartados previos, el conjunto de estímulos estresores, ya sean internos o externos, conducen a la estimulación y liberación de CRH por parte del hipotálamo, uniéndose a su receptor hipofisario, estimulando de esta forma la secreción de ACTH por células corticotropas. La ACTH finalmente llega, a través de la circulación sistémica, a la glándula adrenal y estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides desde la corteza de dicha glándula (Herman et al., 2003). Los glucocorticoides, efectores finales, ejercen su efecto en distintos tejidos, incluyendo a la hipófisis e hipotálamo, donde ejercen acción inhibitoria del eje HHA a través del conocido “*feedback* negativo” (Bosje et al., 2002; Tsigos & Chrousos, 2002).

La CRH es la principal hormona reguladora para la síntesis y secreción de ACTH. Aunque se ha demostrado que la ADH y la oxitocina, también tienen un efecto coregulador en dicha hormona (Herman, Wiegand, & Watson, 1990; Schlosser et al., 1994). Por otro lado, la producción de ACTH también está estimulada por gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como las interleuquinas 1, 1 β , 2 y 6, TNG- α y el factor inhibidor de leucemia (LIF), catecolaminas y la Ang II (Bousquet et al., 1997; Hanson, Mol, & Meij, 2010; Li, Jansen, & Friedman, 1999; Mandrup-Poulsen et al., 1995; Rivier & Vale, 1983); e inhibida por la dopamina, a través del receptor dopaminérgico D2, y por la somatostatina (ss) por medio de sus receptores sst₂, sst₃ y sst₅ (De Bruin, Feelders, Lamberts, & Hofland, 2009; Ferone et al., 2009; Saiardi, Bozzi, Baik, & Borrelli, 1997; Theodoropoulou & Stalla, 2013).

La ACTH es sintetizada por las células corticotropa. El precursor de esta hormona es una macromolécula denominada POMC. La POMC es una prohormona, que según el tipo celular que la sintetice, será metabolizada por distintos sistemas enzimáticos correspondientes a cada tipo celular, generando distintas hormonas o péptidos (Bosje et al., 2002; Tanaka, 2003). En las células corticotropas, la POMC sufre un clivaje por la enzima convertasa tipo 1 (PC1), generando la lipotropina beta (β -LPH) y un fragmento intermediario, quien a su vez es clivado nuevamente por la misma enzima para generar la ACTH (Tanaka, 2003) (Fig.10). La molécula de ACTH, constituida por 39 aminoácidos, comparte los primeros 24 aminoácidos con todas las especies. La ACTH ejercer su acción en la corteza de la glándula adrenal a través de la unión con su receptor de melanocortina tipo 2 (MC2R) (Panagiotakopoulos & Neigh, 2014).

En la *pars intermedia* se encuentran las células melanotropas, que también sintetizan POMC. En estas células, la presencia de la enzima convertasa tipo 2 (PC2), realiza el clivaje de la ACTH en α -MSH y CLIP (péptido intermedio semejante a corticotrofina; sin función conocida) (Tanaka, 2003) (Fig.10). La α -MSH estimula a los melanocitos (células presentes en la piel) a sintetizar melanina para dar pigmento en la piel y el pelo. La secreción de α -MSH es estimulada por CRH. El principal mecanismo regulador de la síntesis de α -MSH es un efecto inhibitorio sobre la misma dado por la dopamina (Castillo, Gómez, Lalia, Cabrera Blatter, & García, 2008; Kempainen, Zerbe, & Sartin, 1989). Las disminuciones en los niveles de dopamina se asocian con menor actividad de la enzima PC2, y consecuente aumento en la concentración de ACTH, debido al menor clivaje y síntesis de α -MSH.

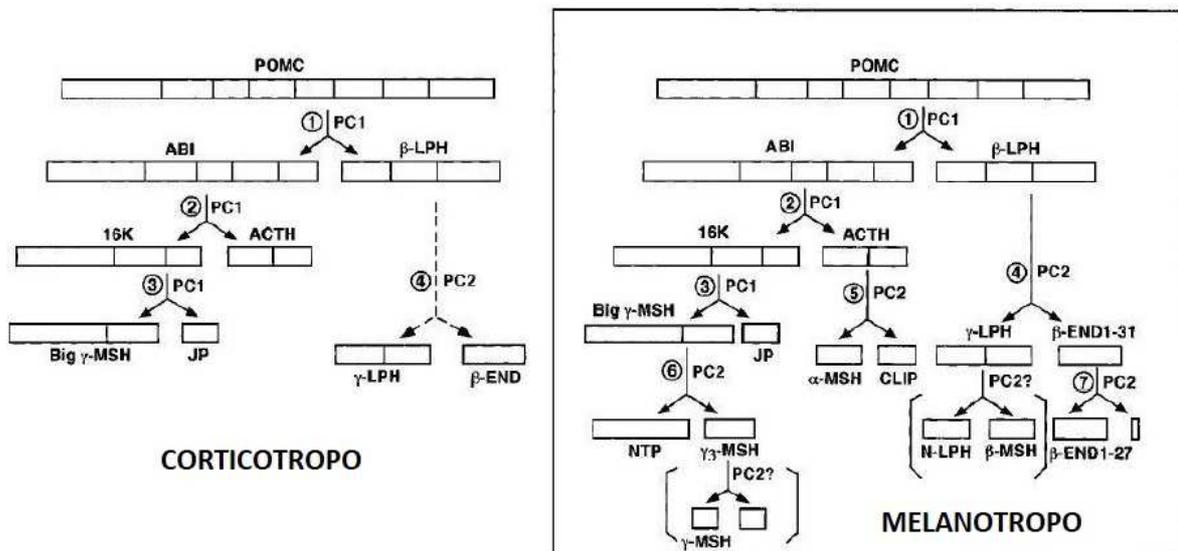


Fig. 10. Procesamiento de la POMC.

La POMC se procesa según el sistema enzimático presente en cada tipo celular. En las células corticotropas se sintetiza ACTH. En las melanotropas se sintetiza α -MSH debido a la presencia de la convertasa tipo 2 (PC2) (Tanaka, 2003).

Es de gran relevancia mencionar que en el perro el ritmo secretor de ACTH y de cortisol no muestra el mismo patrón circadiano que se observa en otras especies, como el ser humano, siendo la secreción de ACTH y cortisol esporádicas, en lugar de ser pulsátiles y rítmicas (Castillo et al., 2009; Kempainen & Sartin, 1984).

4.4. Glándulas Adrenales

4.4.1. Embriología

Las glándulas adrenales se desarrollan en el mesodermo intermedio en relación al polo craneal del mesonefro. Durante la embriogénesis, las mismas se forman a partir del mesodermo que da origen a la corteza y del ectodermo que origina la médula (Panagiotakopoulos & Neigh, 2014).

Las células mesoteliales, que están ubicadas entre la raíz del mesenterio y las gónadas, proliferan y se introducen en el mesénquima. Allí sufren una diferenciación en células de citoplasma acidófilo que van a dar origen a la corteza de la glándula fetal. Luego, una segunda tanda de células mesoteliales, rodean a la masa inicial y forman la corteza adrenal definitiva. Esta última se diferencia en 2 zonas: en la zona glomerular y fascicular a partir del día 45 de la gestación (Sasaki & Nishioka, 1998).

El desarrollo y la diferenciación de las distintas capas de la corteza adrenal está regulada por la expresión de factores de transcripción, como el Pref-1/ZOG, y el factor esteroideogénico-1 (Luo, Ikeda, & Parker, 1994; Okamoto & Takemori, 2000). Posterior al nacimiento, la corteza fetal sufre una regresión, dando lugar a la zona reticular. A medida que se desarrolla la corteza adrenal, algunas células provenientes de la cresta neural, la invaden, organizándose en cordones y acúmulos. Originando a la médula adrenal (Mesiano & Jaffe, 1997).

4.4.2. Anatomía

Las glándulas adrenales se ubican en la zona retroperitoneal en los polos craneales medios de los riñones (Evans & de Lahunta, 2013). Se encuentran craneal a los vasos renales y dorso-lateral a los grandes vasos, ya sean la aorta o vena cava (según sea glándula izquierda o derecha, respectivamente); la adrenal derecha se ubica más hacia craneal que la izquierda. La glándula adrenal derecha se encuentra cercada al hilio renal, debajo de la última costilla. Se relaciona medialmente con la vena cava caudal, ventro-lateralmente está cubierta por el riñón, y cranealmente está cubierta por el hígado. La glándula adrenal izquierda se encuentra debajo del proceso transversal de la segunda vértebra lumbar y del músculo psoas menor. Se relaciona hacia medial con la arteria aorta abdominal, hacia lateral con el riñón, en ventral con el bazo y caudalmente con la arteria y vena renal (Kealy, McAllister, & Graham, 2011) (Fig. 11).

Las glándulas adrenales están formadas por una corteza y una médula. La corteza es color amarillenta por a su alto contenido en lípidos, mientras que la medula es de color rojizo por la gran irrigación venosos.

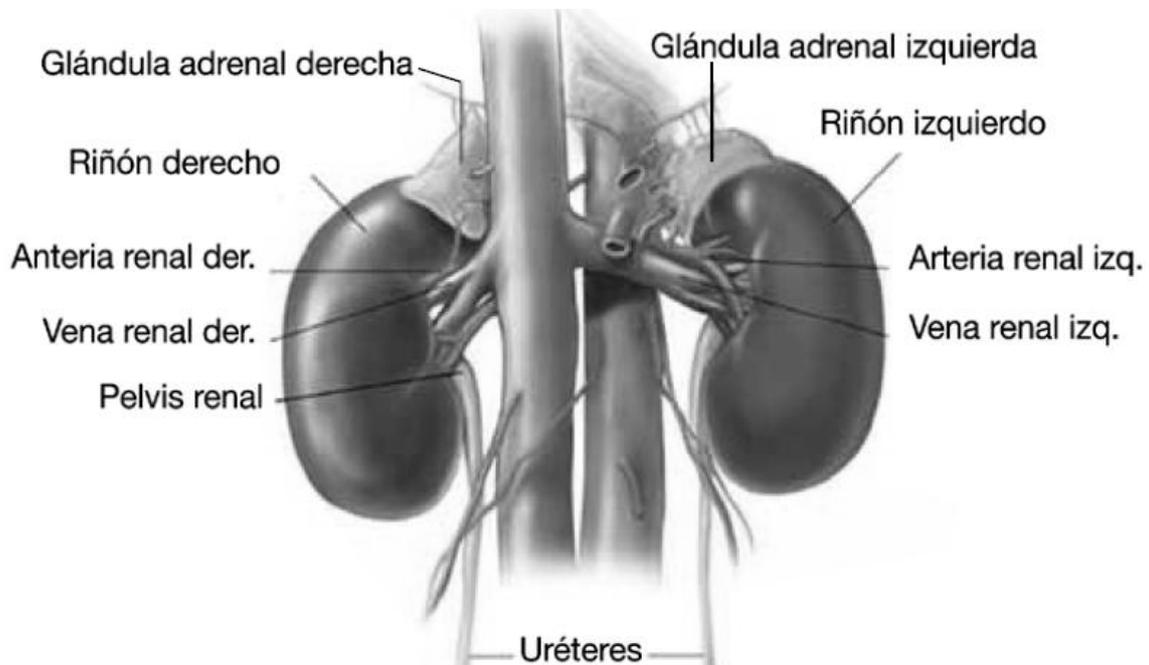


Fig. 11. Ubicación anatómica de las glándulas adrenales (esquema).

Vista ventral (Perel, 2014).

Las glándulas adrenales están irrigadas por ramas de vasos sanguíneos que las rodean como la arteria aorta, arterias renales, arteria frenicoabdominal, arterias lumbares y la arteria mesentérica craneal (Evans & de Lahunta, 2013).

4.4.3. Histología

Las glándulas adrenales están rodeadas de una cápsula de tejido conectivo, de la que nacen trabéculas que se van hacia la corteza adrenal. Por dichas trabéculas discurren vasos sanguíneos y fibras nerviosas hacia la médula.

La corteza adrenal está dividida en tres capas o zonas concéntricas: la zona glomerular, la zona fascicular, y la zona reticular (Ehrhart-Bornstein, Hinson, Bornstein, Scherbaum, & Vinso, 1998) (Fig. 12).

La zona glomerular posee células pequeñas organizadas en forma de grupos redondeados o arcos.

La zona fascicular es la más extensa de las tres. Forma cordones o columnas celulares. Entre ellos se hay capilares fenestrados con disposición radial. Las células son grandes y poliédricas, su citoplasma es levemente acidófilo y tiene gran cantidad de espacios vacuolares, debido al alto contenido de lípidos (se pierde durante la preparación del preparado histológico). Por esta razón es que estas células parecen tener un aspecto “esponjoso” y se las denominan “espongiocitos”.

La última capa es la zona reticular, está formada por un retículo de cordones celulares anastomosados, separados por sinusoides. Estas células son redondeadas o poliédricas, con citoplasma eosinófilo y escasas gotas lipídicas.

No existe un límite perfectamente definido entre corteza y médula adrenal.

La médula está formada por cordones celulares, entre los cuales se hay dispuestos capilares y vénulas (Fig. 12). El citoplasma de estas células contiene gránulos que se tiñen de color pardo debido a la oxidación de las catecolaminas presentes en estas células luego del proceso de fijación para métodos de coloración con tinciones dicrómicas. A esa reacción se la llama cromafin, por este motivo es que a estas células se las conoce como células cromafines (Evans & de Lahunta, 2013). También hay células ganglionares simpáticas, aisladas o en pequeños grupos.

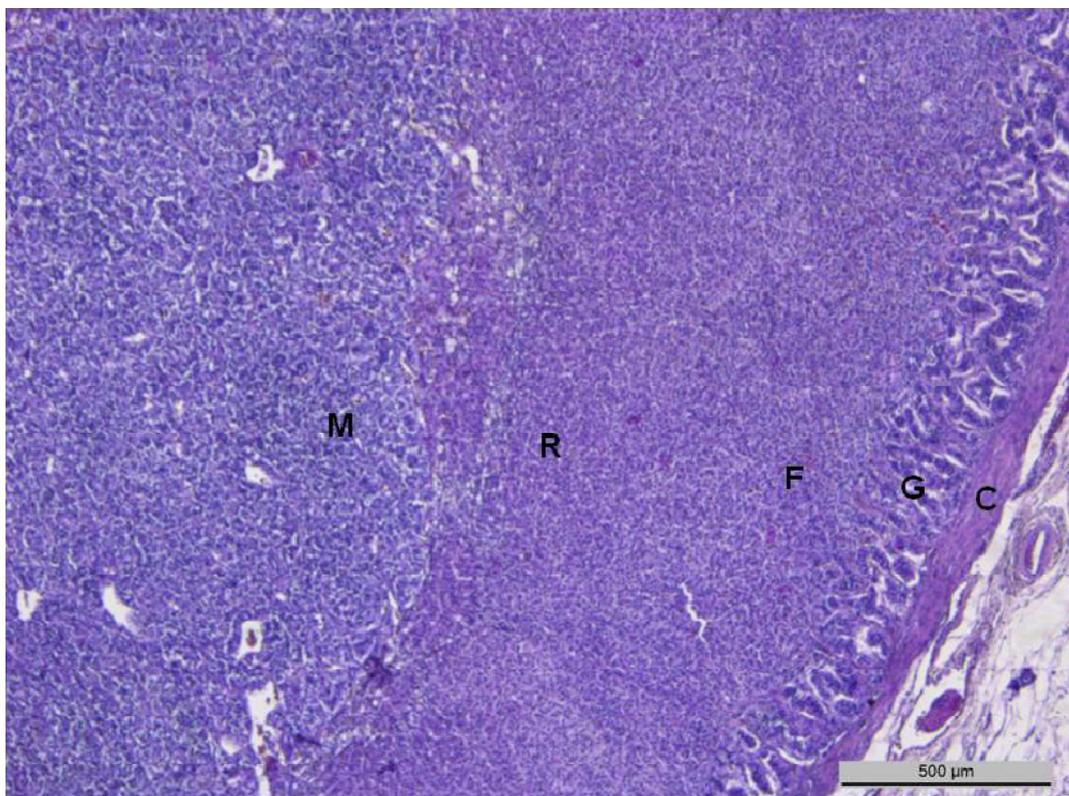


Fig. 12. Corte histológico de glándula adrenal de perro.

Tinción: hematoxilina/eosina. Referencias: cápsula (C), zona glomerular (G), zona fascicular (F), zona reticular (R) y médula (M) (Gallelli, 2015).

4.4.4. Fisiología

Cada una de las diferentes capas de la corteza adrenal (glomerular, fascicular y reticular) posee distintos sistemas enzimáticos que es lo que les permite a cada una sintetizar diferentes hormonas, propias de cada capa, con mecanismos de regulación distintos (Hough, Storbeck, Cloete, Swart, & Swart, 2015; Sanders, Mol, Kooistra, Slob, & Galac, 2016).

En la zona glomerular se sintetiza el mineralocorticoide por excelencia, la aldosterona, encargada del balance hidroelectrolítico del organismo. La síntesis de esta hormona es estimulada principalmente por la concentración de potasio o Ang II, y en menor medida, por la ACTH solo de forma aguda (Miller & Auchus, 2011). En la zona reticular se sintetizan los esteroides sexuales, principalmente los andrógenos, también en respuesta al estímulo de la ACTH. En la zona fascicular, la más extensa, se sintetizan los glucocorticoides, como el cortisol y la corticosterona (Pattison et al., 2007; Young et al., 2003). El cortisol principalmente en el hombre, el perro y rumiantes, entre otros; mientras que la corticosterona es la que predomina en los roedores (Romeo, 2010).

La ACTH es el principal estímulo para la síntesis de los glucocorticoides. Esta ejerce su acción luego de unirse a su receptor adrenal MC2R. Luego de esta unión, aumenta el ingreso de colesterol a las células fasciculares y se estimula la síntesis de las enzimas correspondientes en la esteroidogénesis de la capa fascicular, entre otras (Ariyoshi, Kim, Artemenko, Bhattacharyya, & Jefcoate, 1998; M. S. Brown, Kovanen, & Goldstein, 1979; Chung, B.C., Guo, I.C., Chou, 1997; Faust, Goldstein, & Brown, 1977; Hough et al., 2015; Hu, Hsu, Pai, Wang, & Chung, 2001).

La regulación de la función de la glándula adrenal está mediada por una gran interacción de varios elementos interrelacionados entre corteza y médula, irrigación de la misma, la inervación autonómica que posee, el sistema inmune y factores de crecimiento (Ehrhart-Bornstein et al., 1998). Por esta razón es que las variaciones en las concentraciones plasmáticas de cortisol no siempre son un reflejo exacto de los niveles de ACTH o de la función propia del eje HHA, esta es la razón por la cual se describe cierta “autonomía” por parte de la glándulas adrenales respecto de su regulación hipofisaria (Bornstein, Engeland, Ehrhart-Bornstein, & Herman, 2008; Castillo et al., 2009; Nicholson et al., 1985; Wood, Shinsako, & Dallman, 1982; Wood, Shinsako, Keil, Ramsay, & Dallman, 1982) (Fig. 13).

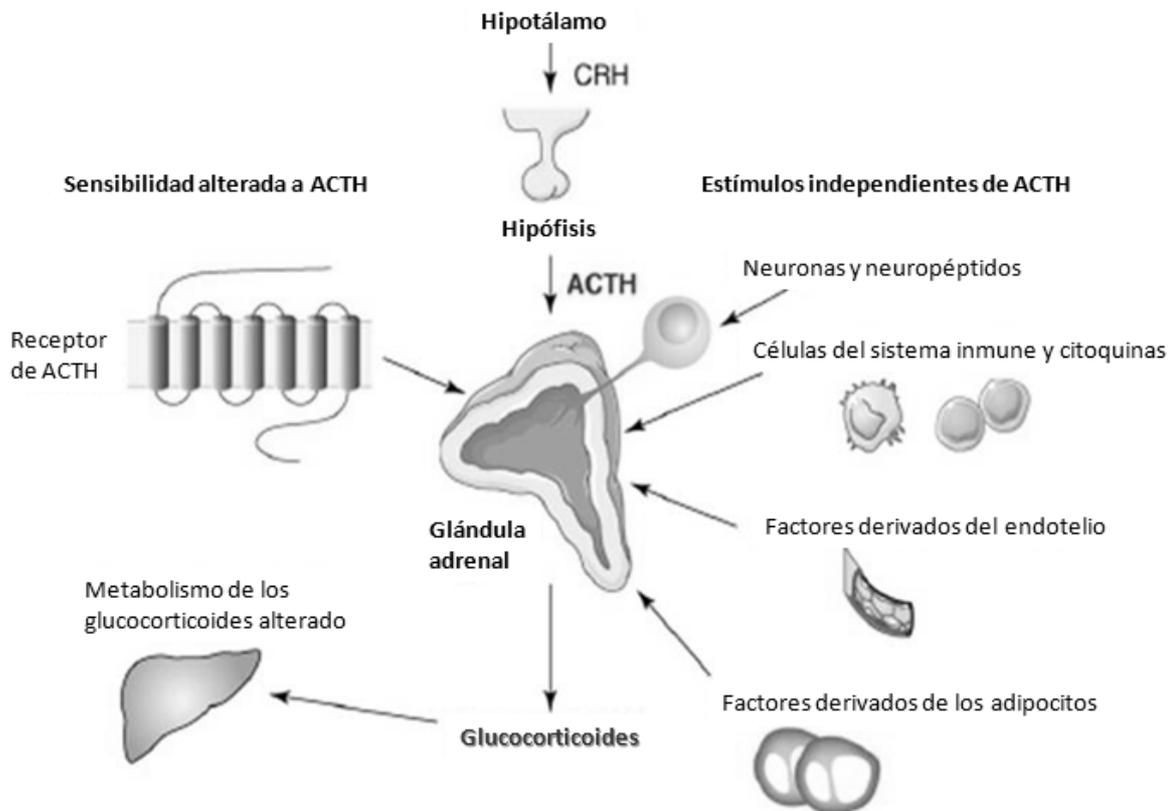


Fig. 13. Esquema de la autonomía de la glándula adrenal en la síntesis de cortisol.

No solo recibe estímulos del propio eje (hipot-hipof), sino que también pueden actuar otros factores para estimular la síntesis de cortisol sin necesidad de la acción de la ACTH (Bornstein et al., 2008).

Al igual que otros tejidos esteroidogénicos, las distintas capas de la glándula adrenal sintetizan sus hormonas esteroideas a partir de un sustrato común: el colesterol (Fig. 14). Este puede provenir de síntesis de *novo*, de lipoproteínas plasmáticas y/o de las reservas de colesterol intracelular, en forma de ésteres. En las células adrenales, la mayor parte de colesterol proviene de lipoproteínas plasmáticas y de reservas intracelulares esterificadas (Bisgaier, Chanderbhan, Hinds, & Vahouny, 1985; Vahouny et al., 1985).

En todos los casos, el paso limitante en la síntesis de esteroides es la transformación de colesterol en pregnenolona, reacción catalizada por el complejo enzimático dependiente de citocromo P450 (P450_{scc}; CYP11A) que se encarga de escindir la cadena lateral del colesterol. Previamente es necesaria la translocación del colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la interna, donde está la enzima P450_{scc}. Esto está mediado por un mecanismo que involucra varias proteínas transportadoras, entre las cuales la más importante es la encargada de regular la esteroidogénesis aguda (StAR) (Miller, 2007; Stocco, 2001).

En la corteza adrenal tanto humana como canina, la síntesis de esteroides involucra la acción coordinada de cinco formas de citocromo P450 y de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), siendo la expresión particular de estas enzimas en cada una de las capas de la corteza lo que determina el tipo específico de esteroide producido. En la zona glomerular, la síntesis de mineralocorticoides requiere la presencia de las enzimas 3 β -HSD, 21-hidroxilasa (P450c21; CYP21A2), 11 β -hidroxilasa (P450c11 β ; CYP11B1) y aldosterona sintasa (P450c11AS; CYP11B2). En la capa fascicular, se requiere de la actividad 17 α -hidroxilasa del citocromo P450c17 (CYP17) para sintetizar corticoides. En el perro, en contraposición al humanos, existe sólo una CYP11B (Sanders et al., 2016). Finalmente para producir precursores androgénicos dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEAS) en la capa reticular, se necesita de la actividad 17 α -hidroxilasa como la 17,20-liasa de P450c17, así como la sulfoniltransferasa (SULT2A1) (Miller, 2007; Samandari et al., 2007).

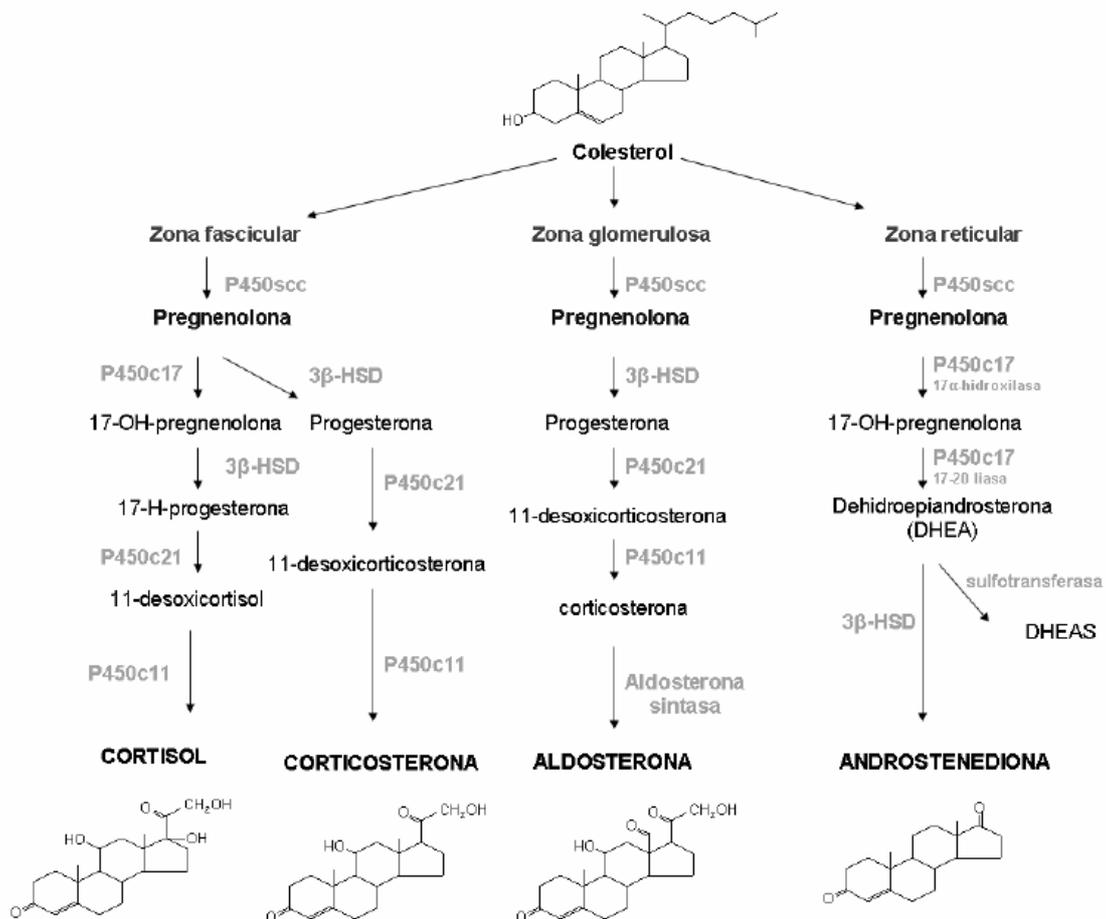


Fig. 14. Estereoidogénesis en corteza adrenal a partir de colesterol.

La estereoidogénesis involucra la acción coordinada de cinco formas de citocromo P450 y la 3 β -HSD. Las principales hormonas esteroideas producidas son cortisol (en perros y primates) y corticosterona (en roedores), aldosterona y androstenediona (Pagotto, 2012)

Los glucocorticoides, luego de su síntesis, son liberados a la circulación para ejercer sus efectos en los distintos tejidos. Dichos efectos son principalmente sobre el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, el sistema hematopoyético, el sistema endócrino, el sistema músculo esquelético, el sistema inmune, el sistema cardiovascular, entre otros y sobre diversos órganos. El cortisol realiza sus efectos a través de dos tipos de receptores intracelulares: receptores de corticosteroides tipo I y de tipo II; también denominados receptores de mineralocorticoides (MR) y receptores de glucocorticoides (GR), respectivamente (R. Ahima, Krozowski, & Harlan, 1991; R. S. Ahima & Harlan, 1990; Cintra et al., 1994; McGimsey, Cidlowski, Stumpf, & Sar, 1991; Morimoto, Morita, Ozawa, Yokoyama, & Kawata, 1996). A nivel central estos receptores se expresan de forma difusa en el hipocampo, hipotálamo e hipófisis. De esta forma el cortisol ejercer su *feedback* negativo a nivel de las neuronas productoras de CRH y ADH en el núcleo paraventricular, en hipófisis lo hace a nivel de las células corticotropas o en distintas regiones del cerebro que se comunican con el hipotálamo (Bradbury, Akana, & Dallman, 1994; Burgess & Handa, 1992; Sawchenko, 1987) (Fig.15).

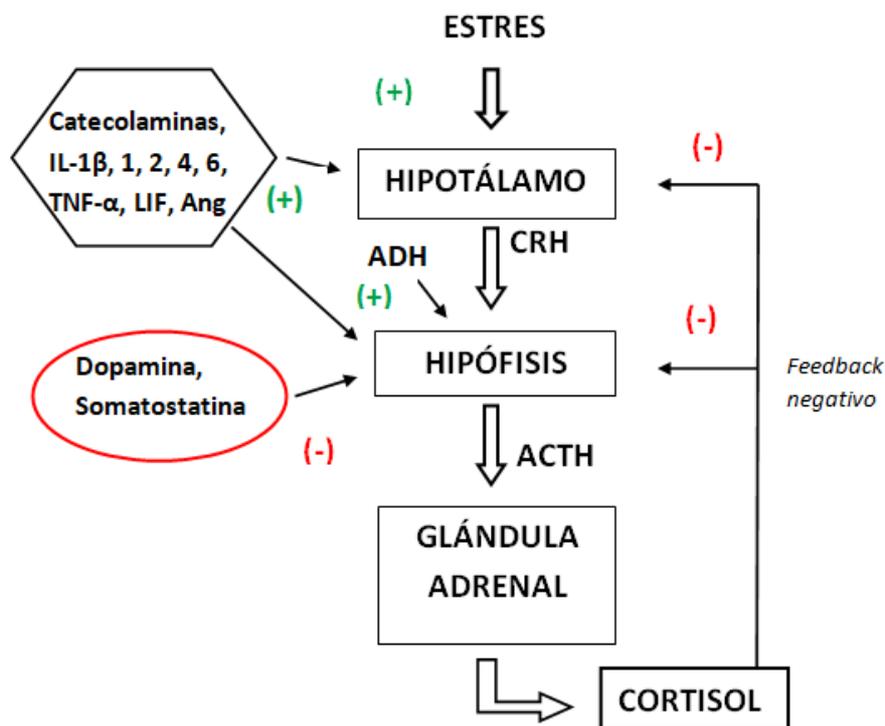


Fig. 15. Esquema del eje HHA y sus regulaciones fisiológicas (simplificado).

La síntesis de POMC/ACTH en hipófisis es inducida por CRH y ADH además de interleuquinas 1β, 1, 2, 4, 6, LIF (Factor inhibidor de Leucemia), Ang II, TNF-α y catecolaminas. La inhibición de la síntesis de POMC/ACTH se realiza a través del feedback negativo que ejerce el cortisol a nivel hipotalámico e hipofisario, inhibiendo la síntesis y liberación de CRH y ADH. También son inhibidores la dopamina y somatostatina. Omitido para simplificar el esquema, la acción del sistema límbico y serotonina, entre otros mediadores químicos.

4.5. Síndrome de Cushing

4.5.1. Generalidades

El Síndrome de Cushing (SC) es una enfermedad insidiosa, crónica y sistémica causada por el exceso de cortisol circulantes de forma crónica, ya sea, por producción endógena de la corteza de la glándula adrenal o de forma exógena, como ser tratamientos crónicos con corticoides (Kooistra, Galac, Buijtels, & Meij, 2009; Pivonello et al., 2007). Está caracterizado por una serie de alteraciones clínicas y bioquímicas que dan el cuadro típico de este síndrome. Esta patología lleva el apellido del neurocirujano, Harvey Williams Cushing, quien la describió por primera vez en el 1932 (Kooistra & Galac, 2012). En humanos, es una enfermedad de muy baja prevalencia, mientras que en el perro, es una de las endocrinopatías más frecuentes, junto a la Diabetes Mellitus y al Hipotiroidismo (Behrend, 2015).

Al hipercortisolismo endógeno se lo puede clasificar como dependiente o independiente de la secreción de ACTH:

4.5.2. Síndrome de Cushing ACTH-dependiente

El Hiper cortisolismo Pituitario Dependiente (HPD) es comúnmente llamado EC, representa el 80-85% de los casos de perros con SC y se debe a la producción excesiva de ACTH por parte de adenomas hipofisarios.

Los adenomas hipofisarios funcionales y productores de ACTH se pueden originar en la *pars distalis* de la hipófisis, también llamada área corticotropa, y se los conoce como corticotropinoma (producido por células corticotropas), así como también, en la *pars intermedia*, ya que ambos tejidos son capaces de sintetizan POMC. Aproximadamente el 70-75% de los adenomas son generados en el área corticotropa y el 20-25% restante, en el lóbulo intermedio (Bosje et al., 2002; Kooistra & Galac, 2012; Kooistra, Voorhout, Mol, & Rijnberk, 1997). Hay reportes de tumores mixtos. Es de gran relevancia tener en cuenta el origen del tumor, ya que esto puede tener particularidades fisiológicas que podrían repercutir al momento del diagnóstico y en el tratamiento de la enfermedad (Castillo et al., 2008).

Según el tamaño tumoral, se los puede clasificar como macro y microadenomas (Asa & Ezzat, 1998; Thapar, Kovacs, Laws, & Muller, 1993), intra y extraselares según si se

proyectan o no por encima de la línea imaginaria que une los bordes anterior y posterior de la silla turca (Gallelli, Cabrera Blatter, & Castillo, 2010) (Fig. 16 y 17).

Se ha reportado que los perros con macroadenomas hipofisarios suelen ser resistentes a la inhibición con dexametasona al momento del diagnóstico (Bosje et al., 2002; Kooistra et al., 1997).

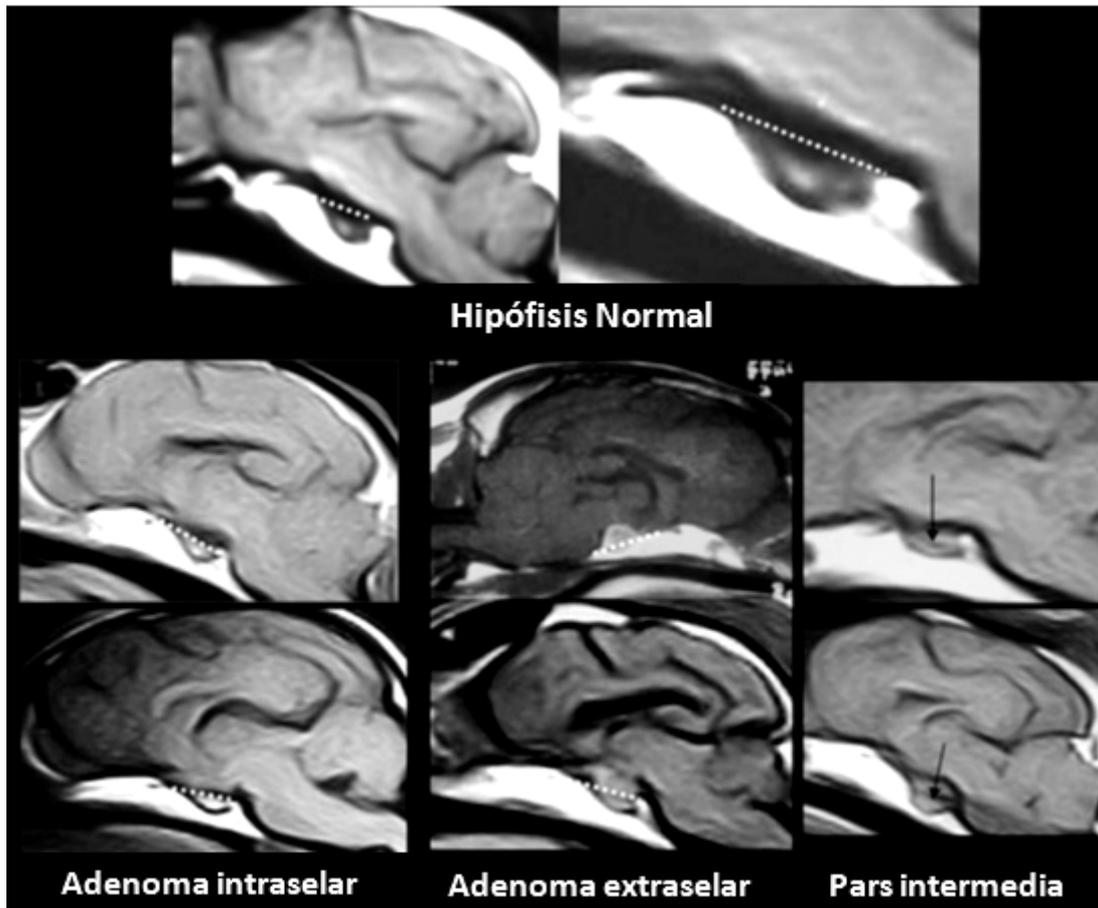


Fig. 16. Resonancia magnética nuclear (RMN) de región selar.

Hipófisis normal, adenomas extra e intraselares y de *pars intermedia* (Gallelli et al., 2010).

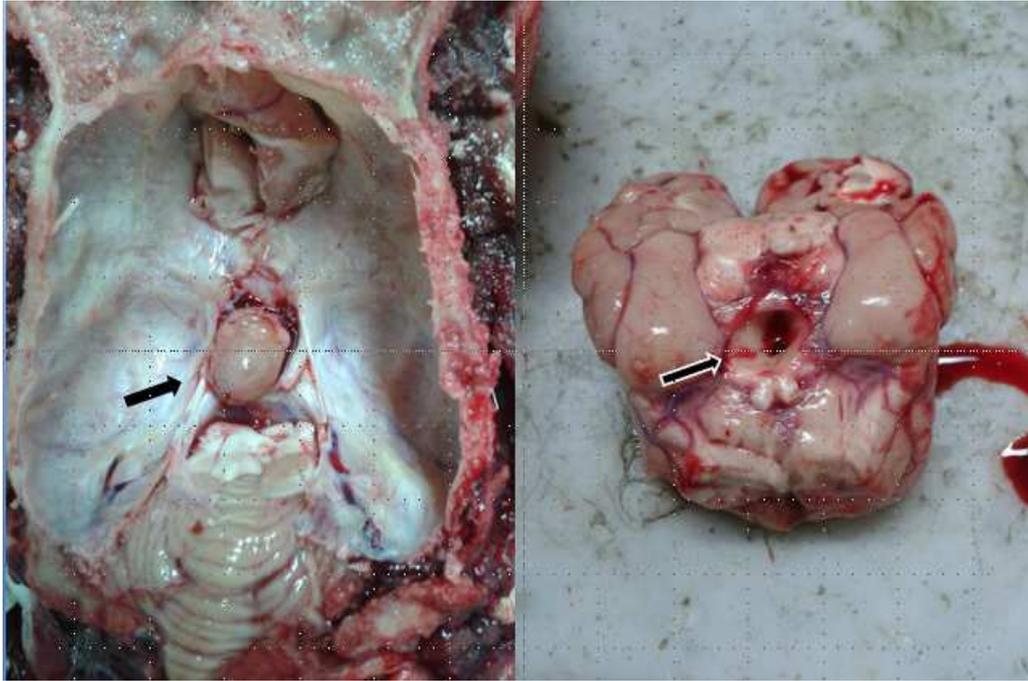


Fig. 17. Macroadenoma hipofisario de perros con EC (necropsia).

Imágenes obtenidas de necropsia. Imagen izq: Tumor ubicado la silla turca anatómica, luego de ser removido encéfalo (flecha negra). Imagen der: Depresión en el encéfalo en la zona donde se ubicaba el macroadenoma (flecha con borde blanco). (Vidal y grupo de trabajo – Hospital Escuela FCV-UBA 2015).

En casos donde existe una desregulación entre el hipotálamo y la hipófisis, a causa de una disminución del tono dopaminérgico o por haber defectos en el receptor dopaminérgico D2, se produce una pérdida de inhibición en la síntesis de POMC, habiendo posteriores aumentos en las concentraciones de ACTH (Colao, Lombardi, & Annunziato, 2000; Pivonello et al., 2004). Estos incrementos se deben a que la dopamina tiene efectos anti-mitogénicos, por lo que su déficit trae como consecuencia el aumento de la ACTH y posible hiperplasia y desarrollo tumoral (Saiardi et al., 1997). Existe otra causa de SC dependiente de ACTH, pero que no depende de síntesis y secreción proveniente de la hipófisis, sino de una producción *ectópica* de ACTH, como síndrome paraneoplásico, por parte de carcinomas pulmonares, carcinomas tiroideos, carcinomas tímicos y bronquiales, feocromocitomas, entre otros. En medicina humana, están bien descriptos estos casos (Witek, Witek, Zieliński, Podgajny, & Kamiński, 2015). Todos ellos corresponden a tumores malignos, de muy difícil diagnóstico y tratamiento. En medicina veterinaria, también se reportó el SC por producción ectópica de ACTH en perros (Castillo et al., 2014; Galac et al., 2005).

4.5.3. Síndrome de Cushing ACTH-independiente

La causa más común de SC ACTH-independiente son los tumores de la corteza de la glándula adrenal, secretores de cortisol, conocido como Hiper cortisolismo Adrenal Dependiente (HAD). Representan aproximadamente el 15-20 % del total de casos de SC en perros. La mayoría son tumores unilaterales, aunque pueden presentarse de forma bilaterales (Ford, Feldman, & Nelson, 1993; Hoerauf & Reusch, 1999; Newell-price, Bertagna, Grossman, & Nieman, 2006).

Según sus características histopatológicas, se los puede clasificar en adenomas o carcinomas, aunque su diferenciación puede ser difícil. Se considera que los carcinomas son más agresivos por ser más invasivos, infiltrativos y tiene la capacidad de producir metástasis. En humanos, se utilizan de forma más rutinaria una serie de marcadores moleculares que permiten una mejor caracterización del tumor, además de la histopatología (Fottner, Hoeflich, Wolf, & Weber, 2004). Los carcinomas suelen tener crecimiento expansivo, a nivel ecográfico se puede inferir por presentar bordes irregulares, y se los suele asociar a menor producción de cortisol (Mendonca et al., 1995). Según el grado de anaplasia que manifiesten, los carcinomas son incapaces de terminar la vía de síntesis de esteroides, liberando a circulación, además de cortisol, aldosterona y andrógenos (Behrend et al., 2005; Fragoso et al., 2015; Hill et al., 2005; Machida et al., 2008).

En medicina humana también está descrito el SC ACTH independiente producido por la presencia de *receptores aberrantes o ilegítimos*. Dichos receptores son aquellos que se expresan de forma *ectópica (no están en la corteza de la glándula normalmente)* o que se *sobre-expresan* en forma *eutópica (si se expresan normalmente en la corteza adrenal)*, y que tienen la capacidad de estimular la síntesis de esteroides como también favorecer el desarrollo de hiperplasia o neoplasia en la glándula adrenal (Christopoulos, Bourdeau, & Lacroix, 2005; Newell-price et al., 2006). Se han identificado numerosos receptores ectópicos: para β -adrenérgicos, para el péptido inhibidor gástrico (GIPR), para vasopresina (V2R y V1bR), para Ang II y para glucagón. Dentro de los eutópicos se detectó la sobreexpresión de receptores de: serotonina, de hormona luteinizante (LHR) y de vasopresina (V1aR) (Christopoulos et al., 2005; El Ghorayeb, Bourdeau, & Lacroix, 2015; Newell-price et al., 2006).

En la actualidad otros receptores ectópicos están siendo estudiados como el de interleuquina -1, TRH y FSH (Christopoulos et al., 2005). Todos ellos pertenecen a la superfamilia de receptores de membrana acoplados a proteína G, por lo que comparten vías intracelulares similares, siendo capaces, de esta forma, de estimular la esteroidogénesis (Lacroix, N'Diaye, Tremblay, & Hamet, 2001).

En medicina veterinaria, se han reportado casos de SC por receptor aberrantes de LH en hurones y en perros por presencia de GIP (Galac, Kars, Voorhout, Mol, & Kooistra, 2008; Schoemaker, Kuijten, & Galac, 2008).

En humanos, también se describe como otra causa de SC ACTH-independiente, a la hiperplasia macro o micronodular adrenal (Fragoso et al., 2015), posiblemente asociada a receptores ilegítimos. Esta condición todavía no fue reportada en perros.

4.5.4. Aspectos clínicos del Síndrome de Cushing

El SC es una de las enfermedades endocrinas que se presenta con mayor prevalencia en el perro. Se observa principalmente en adultos o gerontes, aunque también se puede presentar en animales jóvenes de entre 2-4 años. Hay evidencia de una mayor predisposición en hembras que en machos (Gallelli et al., 2010; Reusch & Feldman, 1991). No hay preferencia por alguna raza en particular, se presenta tanto en perros mestizos como de raza.

Los signos clínicos característicos del SC se deben al hipercortisolismo crónico y son la polidipsia, poliuria, polifagia, aumento de peso, abdomen abalonado (por gran depósito de grasa visceral), atrofia muscular (preferentemente de músculos temporales, en miembros posteriores, músculos abdominales que favorecen el abdomen péndulo), alteraciones dermatológicas (alopecia simétrica bilateral, alteraciones en la textura del pelo, piodermias recurrentes, seborrea, adelgazamiento e inelasticidad cutánea, que dan un aspecto apergaminado y traslucido de la misma, sobre todo en zonas abdominal e inguinal trasluciéndose los vasos sanguíneos; hiperpigmentación, comedones, calcinosis cutis), fragilidad capilar que acompaña el adelgazamiento de la piel, pudiendo aparecer pequeños hematomas cutáneos, alteraciones reproductivas (anestro prolongado, falta de libido, fallas en la espermatogénesis, entre otras), ceguera súbita, disnea o jadeo intenso asociado a posible tromboembolismo pulmonar, entre otras manifestaciones clínicas (Behrend, 2015; Kooistra & Galac, 2012) (Fig. 18 y Fig. 19).



Fig. 18. Aspecto clínico de un perro con SC – Jack Russell, 4 años de edad.

Se observa abdomen abalonado y prominente, leve atrofia muscular, alopecia en ventral de abdomen. (Paciente del la Unidad de Endocrinología – Hospital Escuela. Vidal 2015).

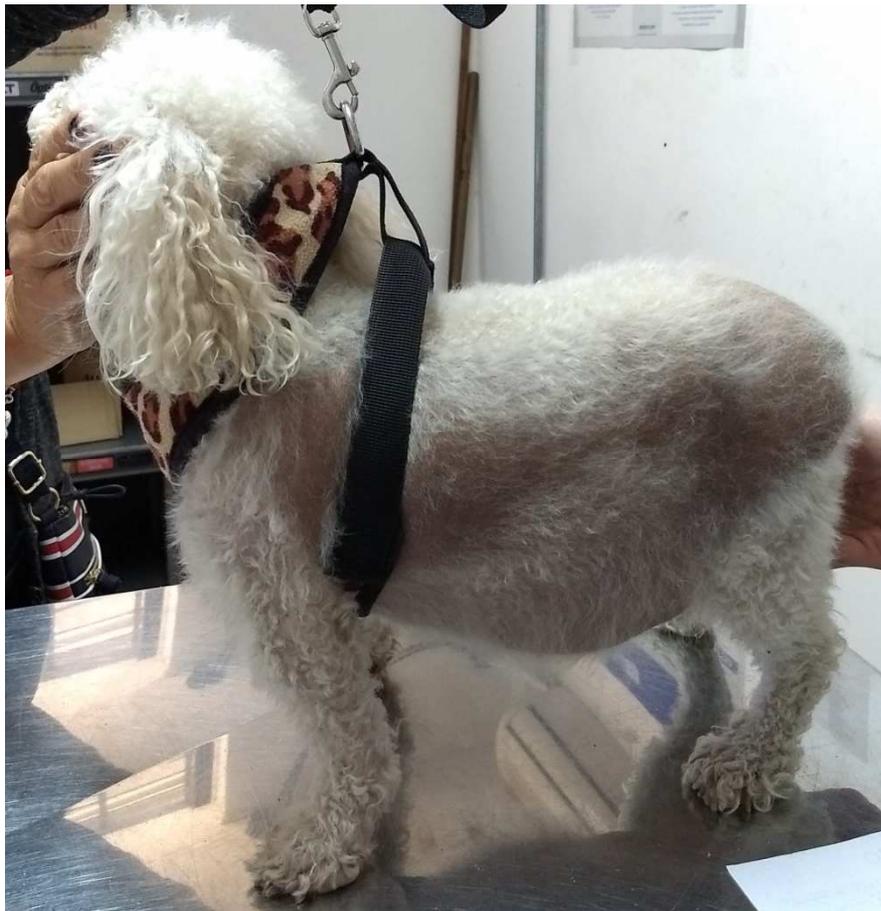


Fig. 19. Aspecto clínico clásico de un perro con SC – caniche, 12 años.

Se observar marcada prominencia abdominal, amplia zona de alopecia en dorsal y lateral del lomo, pelo irsuto y fino. (Paciente particular – Vidal 2018).

4.5.5. Diagnóstico del Síndrome de Cushing

El diagnóstico del SC se basa en la signología clínica, en análisis bioquímicos de rutina y endócrinos específicos, y en el análisis de las imágenes, ya sea Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y ecografía abdominal. Todos ellos son fundamentales y complementarios para poder llegar a un diagnóstico certero del origen del SC.

El diagnóstico de la EC se realiza teniendo en cuenta la presencia de los signos clínicos característicos de la enfermedad, la estimulación con ACTH (que consiste en la medición de cortisol basal y a hora post-estimulación, con 0,25mg de ACTH endovenoso, Synacthen®), y la relación cortisol/creatinina en orina (RCC) recolectadas en la casa del propietarios de dos muestras del día. Luego se indica dexametasona vía oral (0,1 mg/Kg) cada 8 horas. A la mañana siguiente, se toma la última muestra de orina en otro recipiente, para evaluar RCC, según lo reportado por Kooistra and Galac, 2012. El diagnóstico de HAD también se realiza teniendo en cuenta los signos clínicos característicos de la enfermedad, el incremento de la RCC, acá es importante la resistencia a la supresión con altas dosis de dexametasona.

La forma de poder diferenciar el HAD de las formas no suprimibles de EC, es midiendo las concentraciones plasmáticas de ACTH y comparándola con los valores de la RCC.

De forma paralela, se debe realizar el diagnóstico por imágenes correspondiente: en primer lugar se realiza la ecografía abdominal, para la evaluación de las glándulas adrenales tanto en su morfología como en tamaño (pudiendo agregarse la imagen doppler color para evaluar su vascularización), y luego, a través de RMN de región sellar, se visualizará la hipófisis y la región de la silla turca (Gallelli et al., 2010; Miceli, Cabrera Blatter, Gallelli, Pignataro, & Castillo, 2014). Puede agregarse en segundas instancias la Tomografía Axial Computada (TAC) para una mejor evaluación de la relación entre las glándulas adrenales y los grandes vasos en caso de haberse evidenciado por ecografía una masa adrenal.

4.6. Alteraciones metabólicas del Síndrome de Cushing y comorbilidades asociadas

Los signos clínicos son acompañados de otras comorbilidades asociadas que son una consecuencia del hipercortisolismo crónico, como la diabetes mellitus, dislipemias, intolerancia a la glucosa en ayunas e insulinoresistencia, hipertensión arterial y obesidad con predominio del depósito de grasa abdominal y visceral (Cabrera Blatter et al., 2012). La combinación de obesidad central, hipertensión arterial, insulinoresistencia, intolerancia a la glucosa e hipertrigliceridemia se conoce como Síndrome Plurimetabólico.

También se han descrito alteraciones del metabolismo fosfo-cálcico, hipercoagulabilidad (Feelders, Pulgar, Kempel, & Pereira, 2012; P. Vidal, Miceli, & Castillo, 2016) y desarrollo de enfermedad renal y falla cardíaca.

Estas comorbilidades tienen la particularidad de permanecer aunque se haya podido disminuir el nivel de cortisol en sangre, luego de su diagnóstico y tratamiento adecuado.

4.6.1. Síndrome de Cushing e Hipertensión

El SC está asociado a un conjunto de comorbilidades (sección comorbilidades), entre ellas una de gran impacto y prevalencia es la hipertensión arterial. Esta es una de las complicaciones sistémicas más comunes en el SC debido al exceso de corticoides en circulación de forma crónica y sostenida por largos períodos de tiempo, es decir asociada a la duración del hipercortisolismo (Lien, Hsiang, & Huang, 2010).

La prevalencia en medicina humana de pacientes adultos con SC endógeno es de aproximadamente entre un 60-85%, aumentando a 95% en pacientes con secreción ectópica de ACTH (Magiakou, Smyrnaki, & Chrousos, 2006), y 60% en chicos y adolescentes (P. Smets, Meyer, Maddens, & Daminet, 2010), siendo del 20-22% en SC exógeno (Isidori, Graziadio, et al., 2015). En veterinaria, específicamente en perros, se vio que entre el 59-86% de los perros con SC endógeno no tratado presentan hipertensión sistémica al momento del diagnóstico (P. M. Y. Smets, Lefebvre, Kooistra, et al., 2012; P. M. Y. Smets, Lefebvre, Meij, et al., 2012).

Existe pequeñas diferencias en los porcentajes de prevalencia reportos en perros debidas al método de medición utilizado (Goy-Thollot, Péchereau, Kéroack, Dezempte, & Bonnet, 2002; Lien et al., 2010; P. M. Y. Smets, Lefebvre, Kooistra, et al., 2012), y además, existe una diferencia entre SC ACTH-dependiente e independiente, siendo mayor la hipertensión en los ACTH-Independientes según Lien y col., 2010. En el lugar de desarrollo de esta Tesis, el Hospital Escuela FCV-UBA, tuvimos la misma prevalencia en perros con SC evaluados y específicamente de EC, pero además encontramos que el 20% de la hipertensión arterial se debía al incremento únicamente en la presión diastólica (PD) (P. N. Vidal et al., 2018).

Los mecanismos involucrados en la patogenia de la hipertensión arterial sistémica en el SC son complejos y no están del todo claros aun.

Los glucocorticoides inducen hipertensión como resultados de su interacción entre varios mecanismos fisiopatológicos que actúan en la regulación de volumen plasmático, del gasto cardiaco, de la resistencia periférica total y renovascular (Magiakou et al., 2006; P. Smets et al., 2010). Se verían involucrados también el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRA-A), la actividad mineralocorticoidea que poseen los glucocorticoides (mediado por la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β -HSD2)) (Isidori, Graziadio, et al., 2015; Ulick, Wang, Blumenfeld, & Pickering, 1992), los glucocorticoides en estados de hipercortisolismo crónico, potencian la actividad inotrópica del corazón, aumentan la respuesta de receptores β -adrenérgicos a catecolaminas (Heaney, Hunter, Sheridan, & Atkinson, 1999; Yang & Zhang, 2004) ya que aumentan la sensibilidad a la acción de las catecolaminas y del sistema nervioso simpático, disminuyen la vasodilatación a través de la alteración en mecanismos vasodilatadores como la producción de prostaglandina E2, calcitreinas, prostaciclina, y sobre todo disminuye la concentración del NO, por inhibir la eNOS (Barbato & Tzeng, 2004; Chandran, Jaryal, Jyotsna, & Deepak, 2011; Yang & Zhang, 2004).

El NO cumple un rol importante en la vasodilatación y relajación del musculo liso vascular, impide la adhesión, activación y agregación plaquetaria, y tiene efectos antitrombóticos en un endotelio liso y sano (Loscalzo, 1995). Los perros con SC presentan valores bajos en la concentración de NO respecto a perros sanos, en especial aquellos que presentan ceguera (Cabrera Blatter et al., 2011). Al perderse el efecto vasodilatador del NO, se pueden generar numerosos disturbios sistémicos y metabólicos, entre los que se destaca la hipertensión, el tromboembolismo y la ceguera (Loscalzo, 1995; Mitchell & Webb, 2002).

Los glucocorticoides en exceso, como ocurre en el SC, tienen la capacidad de tener acción mineralocorticoidea ya que pueden unirse a receptores de MR además de

receptores de GR (Cicala & Mantero, 2010). Los receptores MR no son selectivos. Estos están protegidos de la unión al cortisol por la 11 β -HSD2, enzima fundamental para modular la acción de la hormona corticosteroide a nivel tisular, ya que es activa a concentraciones muy bajas de cortisol y tiene principalmente actividad deshidrogenasa, inactivando cortisol a cortisona. Cuando el cortisol se encuentra en exceso como en el SC, se satura la capacidad de la 11 β -HSD2, permitiendo que el cortisol se una a los receptores MR, simulando la misma acción de mineralocorticoides. 11 β -HSD2 se encuentra preferentemente en células que expresan receptores MR como corteza renal, colon, glándulas sudoríparas y salivales (Magiakou et al., 2006; P. Smets et al., 2010).

Los corticoides cumplen un rol importante en la disfunción endotelial a través de la disminución en la producción de NO (Chandran et al., 2011) y en la mayor producción de especies reactivas del oxígeno (Iuchi et al., 2003), que de forma directa e indirecta, sumado a lo provocado por su interacción en los mecanismos anteriormente mencionados, terminan conduciendo hacia la hipertensión, remodelación vascular, mayor riesgo cardiaco y de mortalidad (Isidori, Graziadio, et al., 2015; Magiakou et al., 2006; P. Smets et al., 2010).

La Endotelina-1 (ET-1), potente vasoconstrictor, fue reportado aumentado por acción de los glucocorticoides; tiene implicancias en la hipertensión y arteriosclerosis en humanos. Se demostró correlación positiva entre hipercortisolismo y niveles altos de ET-1 (Isidori, Graziadio, et al., 2015). Por esto es considerado como un indicador de disfunción endotelial.

La Ang II es el principal efector del SRA-A. Este sistema es activado a través de la renina, la cual es liberada por células yuxtglomerulares del riñón al detectar menor concentración de sodio o disminución del volumen plasmático, ésta convierte al Angiotensinógeno, sintetizado mayormente en hígado, en Ang I, y finalmente ésta última es convertida en Ang II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), primeramente en la circulación pulmonar (Magiakou et al., 2006), aunque también es formada por otras enzimas no-ECA (enzima generadora de Ang II sensible a la quimiostatina, catepsina G) en los tejidos (D. A. Duprez, 2006).

La acción de la Ang II ocurre a través de la interacción con sus receptores, de los cuales los más conocidos y estudiados son el AT1 y AT2. El AT1 cuyas acciones principales son: retención de sodio, vasoconstricción, formación de aniones superóxido, inflamación, proliferación, fibrosis, trombosis; y el AT2 tiene acciones vasodilatadoras, antiproliferativas y de inducción de apoptosis. Existen el AT3, no se sabe su rol aún y el AT4 que estaría involucrado en la estimulación de síntesis del PAI-1 (D. A. Duprez, 2006).

Se describen otros péptidos derivados de Ang I y Ang II [Ang III, Ang IV, y Ang (1-7)] que están en proceso de estudio para dilucidar sus acciones específicas (Watanabe, Barker, & Berk, 2005).

La Ang II, tiene otras funciones que están involucradas en los mecanismos del desarrollo de hipertensión sistémica, además de la acción comúnmente conocida como potente vasoconstrictor. Dichas funciones son: capacidad para inducir inflamación vascular, alteraciones en la permeabilidad y reclutamiento de leucocitos de la circulación hacia el tejido intersticial a través de la estimulación de liberación de citoquinas y quimiocinas, libera factores de crecimiento vascular endotelial (VGF) permitiendo angiogénesis, participa en la hiperplasia e hipertrofia de células musculares lisas (D. A. Duprez, 2006; Magiakou et al., 2006), participa en la fibrosis de vasos junto con la inflamación y además por la estimulación de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), estimula liberación de metaloproteinasas (MMP), favorece adhesión y síntesis de matriz extracelular, que son fundamentales para la remodelación vascular (Suzuki et al., 2003). También permite agregación y activación plaquetaria (D. A. Duprez, 2004), rol muy importante en el desarrollo de trombosis, comorbilidad de alto riesgo en pacientes con SC.

La Ang II tiene acción sobre el endotelio vascular estimulando la producción de especies reactivas del oxígeno (Touyz, Tabet, & Schiffrin, 2003), en especial el anión superóxido, que colabora en la disfunción endotelial (Endemann & Schiffrin, 2004; Schiffrin, 2004a) impidiendo la formación de NO. Esto es de gran relevancia en la patogenia de la hipertensión, ya que hay varios mecanismos involucrados que atentan contra la vasodilatación, favoreciendo la acción vasoconstrictora y disfunción endotelial, que contribuyen no solo a la hipertensión sino también al riesgo de trombosis por verse afectada la capacidad fibrinolítica fisiológica (Prázný et al., 2008).

La Ang II tiene un rol importante en la fisiopatología de la enfermedad renal y desarrollo de proteinuria, a través de la hipertensión. Tiene acción vasoconstrictora en las arteriolas aferentes y eferentes. La ECA se encuentra, además del endotelio vascular, en las células del epitelio tubular renal (Yanagawa et al., 1991). Puede formarse en el propio riñón como provenir de la circulación sistémica. Sus receptores se encuentran en el glomérulo como en los vasos de los túbulos (Yamada, Sexton, Chai, Adam, & Mendelsohn, 1990).

En la patogenia de la hipertensión en SC y compartido por otras patologías, predominan las acciones de los receptores AT1, que son los mayormente distribuidos en el organismo en adultos, y están relacionados con acciones patológicas como hipertensión, coagulación, inflamación y hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas de vasos sanguíneos (D. A. Duprez, 2006).

Por otro lado, la Aldosterona, hormona esteróidea, potente mineralocorticoide, sintetizado por la zona glomerular de la corteza adrenal, es la encargada de la reabsorción de sodio y agua y excreción de potasio y protones a nivel renal, es un regulador hidroelectrolítico y del volumen y presión sanguínea (D. Duprez, De Buyzere, Rietzschel, & Clement, 2000).

Se describen sus acciones como “genómicas” y “no genómicas”. Genómicas, las conocidas, de acción lenta, mediada por sus MR, que son receptores intracelulares, y por lo tanto permiten transcripción de genes y producción de proteínas que modulan la expresión y actividad de canales epiteliales de sodio y otros transportes de iones (Good, 2007). Mientras que las no genómicas, son más rápidas, mediadas por receptores no clásicos de membrana y por los clásicos MR pero con posterior señalización con segundos mensajeros (Fuller & Young, 2005; Good, 2007).

La aldosterona se ha visto implicada en la inducción vasoconstricción de arterias de resistencia (Arima et al., 2003).

Desempeña un rol importante en el desarrollo de hipertensión arterial y remodelación vascular con engrosamiento, fibrosis y pérdida de elasticidad de los vasos en hipertensión esencial o resistente, como también en casos de hiperaldosteronismo primario (Sartori et al., 2006; Štrauch et al., 2006) preferentemente.

Tiene acción inductora de receptores AT1 de Ang II y se ha visto también una producción local, en vasos, cerebro (Gomez-Sanchez, Ahmad, Romero, & Gomez-Sanchez, 2005) y riñón (Xue & Siragy, 2005). Se demostró la presencia de ARNm de CYP11B2, principal enzima para sintetizar aldosterona, en riñón por Xue and Siragy, 2005, aunque no influye en la circulación sistémica.

La aldosterona cumple un rol en el desarrollo de hipertensión a través del compromiso vascular, cardíaco y renal por su acción en la inducción de inflamación con consecuente fibrosis vascular, cardíaco (Rocha et al., 2002), renal, favoreciendo la hipertensión glomerular (Arima et al., 2003), inflamación vascular, remodelación vascular, disfunción endotelial por estrés oxidativo, acciones compartidas por la Ang II (D. Duprez et al., 2000; Schiffrin, 2004b).

4.6.2. Síndrome de Cushing y Enfermedad Renal

Los glucocorticoides influyen desde el desarrollo al riñón fetal, estimulando la función de algunos receptores como por ejemplo los de Ang II, ADH, ACTH y leptina, enzimas metabólicas, canales epiteliales de Na⁺, Na⁺ / K⁺ + ATPasa y transportadores de iones Na⁺ / H⁺ y aquaporinas (Constancia et al., 2005; Fuglsang & Ovesen, 2006), como también influyen en la función glomerular y tubular en los riñones maduros. La exposición prenatal a glucocorticoides lleva a una disminución en el desarrollo de nefronas, repercutiendo en la vida adulta llevando a la hipertensión (Dickinson, Walker, Wintour, & Moritz, 2007).

La exposición a elevadas concentraciones de cortisol de forma crónica lleva a daños en parámetros de funcionalidad renal como ser la presencia de proteína en orina, alteraciones en la tasa de filtrado glomerular (GFT) (Baas, Schaeffer, & Joles, 1984; P. M. Y. Smets, Lefebvre, Kooistra, et al., 2012; P. M. Y. Smets, Lefebvre, Meij, et al., 2012), densidad urinaria (P. Smets et al., 2010).

También tiene repercusión sobre el sistema cardiovascular (Erem et al., 2009), lo que conducen a cambios vasculares, como ser disfunciones endoteliales, alteración en mecanismos vasodilatadores (Yang & Zhang, 2004), remodelación vascular (Rizzoni et al., 2009), aumento de la resistencia periférica y de arteriolas renales, y cambios hemodinámicos sistémicos que en conjunto afectan la presión sanguínea, por ende afectan el flujo sanguíneo renal y la función glomerular (Scholz, Sprague, & Kernohan, 1957; P. Smets et al., 2010).

Entre 50% y 75% de los perros con SC, presentan proteinuria al momento del diagnóstico (Lien et al., 2010; P. M. Y. Smets, Lefebvre, Kooistra, et al., 2012) y el 86% presentan hipertensión.

La hipertensión arterial cumple un rol importante en el desarrollo de enfermedad renal y en su progresión en humanos como en animales domésticos (Finco, 2004).

La hipertensión sistémica conduce a un aumento de la presión hidrostática capilar que causa hiperfiltración a nivel renal (P. Smets et al., 2010).

Dentro de los mecanismos de lesión renal, se establece al hiperfiltrado como comienzo del daño, ya que altera la permeabilidad del capilar glomerular a macromoléculas, aumenta la presión intraglomerular e incrementa la excreción de proteínas hacia la orina, la albumina especialmente (Martíarena et al., 2007; Smets et al., 2010). La presencia de proteína en el glomérulo tiene un efecto nefrotóxico perpetuando el mecanismo de daño. La proteinuria persistente aumenta el riesgo de morbi-mortalidad

en humanos, perros y gatos, por acelerar el deterioro de la función renal (Lees, Brown, Elliott, Grauer, & Vaden, 2005).

El hipercortisolismo crónico inducen hipertensión por diversos mecanismos (explicado en el apartado SC e Hipertensión) además de sus acciones afectando el tono vascular y permeabilidad que repercuten a nivel renal (Haentjens et al., 2005).

Existe evidencia que los triglicéridos y el colesterol elevados, como las dislipemias, presentes en endocrinopatías (Smajić, Hasić, & Rašić, 2018), generan daño glomerular favoreciendo la enfermedad renal y proteinuria (J. Chen et al., 2004; Kasiske, O'Donnell, Garvis, & Keane, 1988).

El síndrome metabólico, cuadro que comparte alteraciones comunes con el SC (obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipertensión, hiperglucemia y dislipidemia), todas estrictamente están asociadas con obesidad (Boscaro, Giacchetti, & Ronconi, 2012). Y la obesidad está asociada con la hipertensión sistémica y glomerular leve y con el desarrollo de lesiones renales (Joles, 1998).

4.6.3. Síndrome de Cushing e Hipercoagulabilidad

Las complicaciones tromboticas secundarias a enfermedades se están reportando con mayor frecuencia en medicina veterinaria. En perros, muchas enfermedades se asocian con la predisposición a la formación de trombos, como ser enfermedades inmunomediadas, enteropatías y nefropatías perdedoras de proteínas, enfermedades cardiacas, sépsis, algunas neoplasias, administración crónica de corticoides exógenos y el SC (Boswood, Lamb, & White, 2000).

La hipercoagulabilidad implica un alto riesgo de desarrollar trombosis en arterias y/o venas, la más común en perros es en venas pulmonares, venas esplénicas, arterias aorta e iliacas (Laurenson, Hopper, Herrera, & Johnson, 2010; Park et al., 2013) (Fig. 20), donde la complicación más frecuente es el TEP (Fig. 21) con alta tasa de mortalidad (Burns, Kelly, Hornof, & Howerth, 1981).

Epidemiológicamente se ha reportado que el riesgo de trombosis es 4 veces más alto en pacientes humanos con SC respecto a individuos sanos, y que la hiperactivación de los sistemas de coagulación están involucrados en el desarrollo de trombos tanto en humanos como en perros (Teshima et al., 2008). El riesgo de mortalidad en pacientes con SC también es 4 a 5 veces mayor comparado con el resto de la población, debido a la alta tasa de complicaciones tromboembólicas (Jacoby, Owing, Ortega, Gosselin, & Feldman, 2001) a causa de la disfunción endotelial, hipercoagulabilidad y estasis

vascular como consecuencia del hipercortisolismo crónico (Obiols Alfonso, Biagetti Biagetti, Chacón Oreja, & Salvador Rodríguez, 2014).

Por ejemplo en humanos, el SC se asocia con el desarrollo de embolia pulmonar y trombosis venosa profunda con riesgo de muerte (Small, Lowe, Forbes, & Thomson, 1983). Se comunicó que un 22% de perros con nefropatía perdedora de proteína por daño glomerular también presentaron tromboembolismo arterial y venoso como complicación secundaria (Cook & Cowgill, 1996; de Laforcade, 2012).

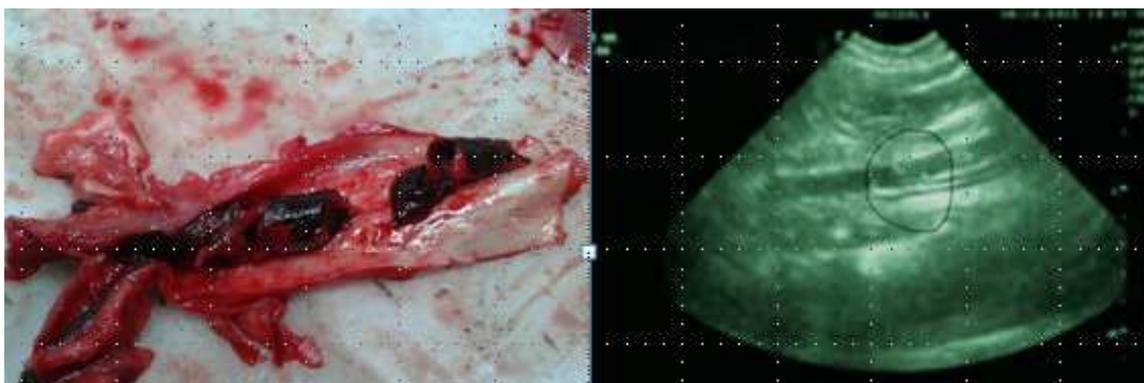


Fig. 20. Tromboémbolo en Arteria Aorta distal en perro con EC.

Imagen Izq: trombo de 10 cm de largo aprox. adherido a la pared de la A. Aorta Distal previo a la bifurcación de las A. Iíacas obstruyendo la luz de forma completa, obtenido por necropsia. provocando un cuadro de trombosis completa involucrando ambos miembros posteriores. Imagen Der: Imagen ecográfica del mismo vaso, se ve el trombo obstruyendo la luz del mismo, impidiendo el flujo sanguíneo (Vidal – Sala de necropsia y ecografía de Hospital Escuela FCV-UBA. 2016).

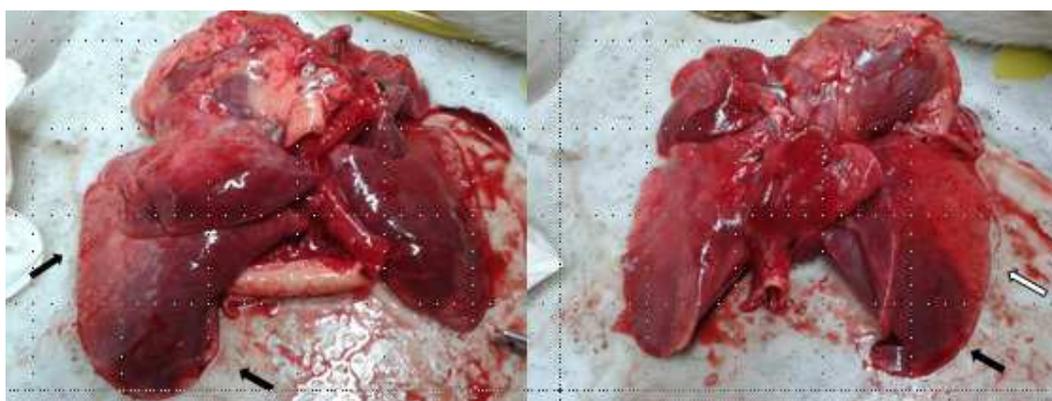


Fig. 21. TEP en perro con EC - imagen de necropsia.

Las flechas negras muestran las zonas comprometidas por los trombos sin capacidad de ventilar en vida, zonas oscurizadas no ventiladas. Las zonas más claras (la flecha blanca), muestran las zonas todavía con algo de capacidad ventilatoria. (Vidal – Sala de necropsia y ecografía de Hospital Escuela FCV-UBA. 2016).

Los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la formación de trombos se lo conoce comúnmente como “*la Triada de Virchow*”, su nombre deriva de quien realizó el aporte que fue un médico y patólogo alemán Rudolf Virchow, quien postuló que existen tres situaciones que predisponen la formación del mismo: lesión endotelial o injuria vascular, alteraciones del flujo sanguíneo (estasis o turbulencia) e hipercoagulabilidad, la alteración de uno de sus componentes o su desequilibrio predisponen los estados protrombóticos (Majluf-Cruz & Espinosa-Larrañag, 2007).

La hipercoagulabilidad se la ha descrito como un estado de coagulación alterado que predispone a la formación de trombos. Estos estados se caracterizan por un aumento de la activación plaquetaria y de los factores de coagulación, reducción de los anticoagulantes endógenos y/o una fibrinólisis reducida (de Laforcade, 2012).

Por otro lado, los mecanismos de coagulación están correctamente balanceados para que de forma fisiológica la sangre fluya normalmente y ante una injuria en un vaso, se forme un coágulo el cual bloquee la salida de sangre. Las complicaciones ocurren cuando no existe un correcto balance entre todos estos mecanismos.

Los glucocorticoides inducen hipercoagulabilidad en el SC (Obiols Alfonso et al., 2014), esto sumado a sus comorbilidades contribuyen al riesgo de trombosis como la obesidad visceral, hipertensión, alteración en el metabolismo de la glucosa, hiperlipidemias, alteraciones cardiovasculares (Trementino et al., 2010). Este efecto provocado por los glucocorticoides, endógenos como los exógenos provenientes de tratamientos de terapias prolongadas de prednisolona, dexametasona, metilprednisolona, producen el mismo efecto (Isidori, Minnetti, Sbardella, Graziadio, & Grossman, 2015; Luchi et al., 2003; Teshima et al., 2008).

El estado hipercoagulable se debe a desbalances entre los factores anticoagulantes y procoagulantes que permiten mantener la sangre fluida en los vasos, habiendo una mayor tendencia hacia la procoagulabilidad e hipofibrinólisis (Klose, Creevy, & Brainard, 2011). Algunos factores de coagulación que se describen involucrados son el factor II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, FvW, PAI-1, ATIII (Erem et al., 2009; Fatti et al., 2000; Klose et al., 2011; Manetti et al., 2010; Trementino et al., 2010; P. Vidal et al., 2016). Datos reportados en humanos como también en perros con SC (Casonato et al., 1999; Jacoby et al., 2001; Kastelan et al., 2009; Teshima et al., 2008).

El FvW es una glicoproteína sintetizada y secretada por células endoteliales y plaquetas, encargada de mediar la adhesión de estas últimas al subendotelio vascular en caso de injuria (Giblin, Hewlett, & Hannah, 2008). Este factor es liberado luego de la activación de las plaquetas.

El PAI-1 tiene como función fisiológica principal y más conocida la de limitar la fibrinólisis. También cumple otras funciones como en la adhesión, desprendimiento y migración celular (Dellas & Loskutoff, 2005). Es sintetizado por células endoteliales, células del músculo liso, y es acumulado y liberado por plaquetas luego de su activación (Reilly, Fujita, Hutzelmann, Mayer, & Shebuski, 1991). Estudios en ratones muestran que también se encuentra en corazón, pulmón, aorta, músculos, hígado, tejido adiposo, y se vio presencia de genes para su expresión en distintos cultivos celulares (células epiteliales, megacariocitos, fibroblastos, algunas células tumorales) inducido por diversos factores de crecimiento, citoquinas y hormonas (Dellas & Loskutoff, 2005). El PAI-1 se encuentra estimulado por los glucocorticoides (Kastelan et al., 2009; Oikarinen, Höyhty, & Järvinen, 1990; Trementino et al., 2010).

La ATIII, es un inhibidor de serina proteasa (serpina), de 58000 - 65000 Dalton, similar a la albumina (Donahue, Brooks, & Otto, 2011; Kauffmann, Veltkamp, Van Tilburg, & Van Es, 1978; Vaziri et al., 1984), que juega un papel importante en la regulación de la coagulación de forma fisiológica como el principal inhibidor de la trombina (factor II activado) y el factor X activado (Flores-Rivera, Meza-Márquez, Nava-López, & Ramírez-Morales, 2014; Isidori, Minnetti, et al., 2015) . Permite mantener la sangre fluida y regula la formación de coágulos.

El DD, es un producto de degradación de la fibrina que suele incrementarse en procesos de fibrinólisis y formación de coágulos de forma fisiológica. Es utilizado tanto en medicina humana como en veterinaria, como marcador de trombosis (Epstein, Hopper, Mellema, & Johnson, 2013; Nelson & Andreasen, 2003; Stokol, Brooks, Erb, & Mauldin, 2000).

5. HIPÓTESIS

5.1. Principal:

- En caninos con EC habría aumentos en las concentraciones de Aldosterona y Ang II, y disminución de NO, provocando hipertensión y daño glomerular.

5.2. Secundaria:

- La hipercoagulabilidad observada en la EC se relaciona con la proteinuria de origen glomerular y presión arterial, predisponiendo a la formación de tromboémbolos.
- El uso de inhibidores α -adrenérgicos sería útil para controlar la tensión arterial y lograría disminuir la proteinuria evitando el progreso hacia la Insuficiencia Renal Crónica (IRC), siendo un efectivo renoprotector

6. OBJETIVOS

- Estudiar variaciones en las concentraciones de Aldosterona, Ang II y NO en presencia de hipercortisolismo y evaluar su relación con la progresión hacia la IRC en perros con EC, y el desarrollo de hipercoagulabilidad en los mismos.
- Implementar terapias coadyuvantes que permitan prevenir y/o minimizar las alteraciones renales en la EC, retardando el desarrollo de IRC.
- Establecer variables predictivas de daño renal e hipercoagulabilidad para su prevención y/o temprana detección.
- Evaluar relación entre proteinuria y tensión arterial.

MATERIALES y
MÉTODOS

7. MATERIALES y MÉTODOS

7.1. Experiencia 1: “Relación entre presión arterial y parámetros renales, NO y cortisol”

Población en estudio:

➤ Población con EC: se estudiaron 20 perros con EC (11 hembras y 9 machos, de los cuales 10 eran mestizos; 3 Poodles; 3 Beagles, 2 Golden Retrievers, 1 Daschund and 1 Pit bull), siendo el rango etario de 4 a 15 años (mediana de 9.9 años) y el peso comprendido entre 3.1 a 35 kg (mediana 11.9 kg). Todos los perros fueron diagnosticados en la Unidad de Endocrinología del Hospital Escuela FCV-UBA donde fueron referidos por colegas de la actividad privada.

Los perros presentaban los signos característicos del SC: polidipsia, poliuria, polifagia, piel fina e inelástica, pérdida de pelo, abdomen abalonado, aumento de peso. El diagnóstico se confirmó por medio de la RCC en orina antes y después de la administración oral con dexametasona (Galac, Kooistra, Teske, & Rijnberk, 1997) estimulación con ACTH (medición del cortisol basal y a la hora post administración endovenosa 0,25 mg de ACTH), medición de ACTH plasmática, ecografía abdominal donde se evaluaron glándulas adrenales, morfología y tamaño, y RMN de la región sellar (Gallelli, Cabrera Blatter, & Castillo, 2010; Miceli, Cabrera Blatter, Gallelli, Pignataro, & Castillo, 2014; Kooistra & Galac, 2012).

Ninguno de estos pacientes presentaban enfermedades concurrentes (cardiopatías, nefropatía clínicamente evidente, infecciones urinarias, diabetes mellitus, neoplasias ni enfermedad infecciosa sistémicas), ni recibían o habían recibido tratamiento para el SC previo a realizar el diagnóstico.

Una vez efectuado el diagnóstico y posterior aceptación por parte del propietario de participar su mascota en el estudio por medio de consentimiento informado por escrito, a los perros se les procedió a realizar los estudios previstos.

A todos los perros se les indicó el mismo tratamiento para el control de la EC utilizado en nuestra institución, consistente en suministrar una combinación de Cabergolina 0,07mg/kg/semana y ácido retinoico (isotretinoína 9-cis)2 mg/kg/día (Castillo et al., 2006, 2008).

➤ Población control o Testigo: se utilizó una población de 12 perros sanos (6 hembras castradas y 6 machos no castrados, mediana de edad 6 años, rango 3-10 años) provenientes de los caniles de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, a los cuales se les realizó las mismas determinaciones que a la población con EC, excepto el radio-renograma excretor (por indicación del comité de ética) tomándose los valores estandarizados de estudios previos como referencia. Todas las determinaciones se realizaron en el área de los caniles donde los perros están familiarizados con el entorno con el propósito de minimizar alteraciones producto del estrés al realizar las maniobras necesarias para el estudio.

Estudios realizados:

Los procedimientos fueron los mismos en ambas poblaciones, describiéndose el procedimiento en la población con EC, ya que las mismas fueron realizadas en un área especialmente acondicionada dentro del Hospital Escuela. No se utilizaron fármacos de acción sedante para evitar alteraciones en la presión arterial o cambios de flujo sanguíneo al estudio doppler. El dueño siempre estuvo presente y en contacto con el perro.

Medición de la presión arterial:

Al momento de la consulta a todos los perros se les midió la presión arterial, tanto PS como PD, a través del método oscilométrico de alta definición (VetHDO monitor MD/90, Systeme & Beratung, Germany). El procedimiento se realizó luego de 30 minutos de estar el animal familiarizado con el entorno (lugar, voces, camilla, personal) y se encontrara relajado. Al perro se lo posicionó en decúbito esternal sobre la camilla, colocándose el manguito insuflador en el miembro anterior izquierdo (arteria cefálica antebraquial) realizándose 4 mediciones consecutivas con el propósito de que el perro se adapte en las primeras mediciones a la presión del manguito insuflado y al ruido del tensiómetro. La última medición era tomada como el valor de referencia.

La hipertensión arterial fue definida como PS > 160 mmHg y/o PD > 90 mmHg (Bodey & Michell, 1996; Brown et al., 2007).

Ecografía con estudio Doppler renal:

Posteriormente a la medición de la presión arterial y treinta minutos previos al estudio (con el propósito de recuperarse del estrés por la maniobra) la zona de proyección renal fue tricotomizada y el animal posicionado en la camilla. Luego del descanso se procedió a colocar el gel acústico procediéndose al estudio, siendo siempre realizado por el mismo operador. A los animales se los colocó en decúbito lateral derecho e izquierdo para evaluar los riñones correspondientes, utilizándose un equipo MINDRAY M5VET, sonda microconvex multifrecuencial 3-7,5 MHZ. Primero se observó el aspecto morfológico de ambos riñones, no debiendo los mismo presentar alteraciones al estudio (calcificaciones, hidronefrosis, quistes, cambios parenquimatosos, atrofia o signos de degeneración), siendo excluidos del estudio de presentarse alguna anomalía. Posteriormente por medio del Doppler se evaluó el IR de la arteria renal, tanto izquierda como derecha, considerándose normal un $IR \leq 0.7$ (Morrow, Salman, Lappin, & Wrigley, 1996; R Novellas et al., 2008; Rosa Novellas, Espada, & De Gopegui, 2007).

Radio-renograma excretor en cámara gama:

Con el propósito de evaluar el filtrado glomerular se procedió a realizar un estudio centellográfico dinámico renal (radio-renograma excretor) en cámara gamma planar. Se utilizó como radioisótopo ^{99m}Tc (tecnecio 99 metaestable pertecneciato de sodio; DTPA $\text{CaNa}_3\text{-Sn}$ RADIOFARMA[®] TC, 3-4mCi o 111-148 Mbq) a una distancia fija de 26 cm sobre el centro de la cámara gamma. Primero se tomaron imágenes estáticas de las jeringas con el radiotrazador (pre y post inyección intravenoso en bolo) y del paciente en posición decúbito lateral para medir la profundidad renal y posteriormente calcular el filtrado glomerular. Posteriormente se colocó al animal en posición decúbito ventral y con la cámara gamma centrada hacia dorsal de los riñones. Se adquirieron imágenes en forma dinámica cada 15 segundos en matriz digital 64 x 64 x 16, durante 15 minutos. No fue necesaria la sedación de los perros para realizar el estudio.

A los fines del presente estudio se determinaron dos parámetros: 1) GFT; 2) RT inicial de cada riñón (punto en que la curva alcanza su máxima actividad luego de la aplicación del radiotrazador, indicando el tiempo de máxima filtración glomerular).

Por medio del procesamiento de imágenes, y obtención de la curva de función glomerular, se valoraron las fases de perfusión, filtración glomerular y de eliminación del radiotrazador.

Se considera que el GFT debe ser $>3\text{ml/kg/min}$ para un riñón sano, siendo indicativos de insuficiencia renal subclínica valores entre 1.2 y 2.7 ml/kg/min y azotemia a valores $<1.2\text{ ml/kg/min}$. El RT considerado normal es <3.5 minutos, correspondiendo a riñones con alteración funcional valores que >5 minutos y sospechoso entre 3.6 y 4.9 minutos. (Bartges & Polzin, 2013).

Estudios bioquímicos:

La extracción de sangre y de orina para realizar todos los estudios bioquímicos fueron obtenidas al día siguiente de los estudios antes descritos. De la misma muestra de sangre, luego de obtenido el suero, se evaluó urea, creatinina, proteína total, albúmina, NO y cortisol. Luego de la extracción de sangre se separó el suero por centrifugación y se congeló a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras de sangre fueron tomadas en ayunas de 12hs y recolectadas en tubos de plástico sin anticoagulante.

Las mediciones de urea, creatinina, proteína total y albúmina se realizaron en un equipo automatizado (Metrolab 2100), por método colorimétrico-enzimático estandarizados, utilizando los reactivos específicos y según indicación del fabricante.

Por sondaje se obtuvo una muestra de orina en frasco estéril inmediatamente posterior a la extracción de sangre. Se realizó el urianálisis completo (físico-químico, considerando normal la densidad urinaria >1025 con ingesta líquida y micción normales para el peso del perro) y evaluación cuanti-cualitativa de la proteína en orina. La cuantificación de proteína en orina se realizó por medio del UPC, considerándose como valor normal ≤ 0.3 , dudoso entre 0.31 y 0.49 y francamente patológicos valores >0.5 (Martiarena et al., 2007). Para la determinación cualitativa de proteína, se realizó la separación de cada una de sus fracciones por peso molecular (PM), efectuado en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio técnica de SDS-PAGE (con coloración argéntica rápida) considerándose fisiológico una leve banda de proteínas de peso molecular (PM) de 69 kd (20 mg/L). Las corrida en $\text{PM} \geq 69\text{ Kd}$ es indicativo de proteína de origen glomerular y con corrida en $\text{PM} <69\text{ Kd}$ proteína de origen tubular (Martiarena et al., 2007; Marshall & Williams, 1998; Zini, Bonfanti, & Zatelli, 2004).

Determinación del cortisol y óxido nítrico:

El cortisol sérico se evaluó por método ELISA (“Cortisol ELISA, ABCAM”), con un coeficiente de variación intra e interensayo de 4.8 y 7.8 % respectivamente y sensibilidad de 0.4 µg/dL. El rango de referencia obtenido por nuestro laboratorio a partir de una población testigo o control fue de 0.8-4.5 µg/dl (mediana 2.1 µg/dl).

El NO fue medido según se describió previamente por Cabrera Blatter et al., (2012), por método ELISA (BioVision, EE.UU) calculándose la producción de NO a través de los nitritos y nitratos producidos (NO *nit/nit*). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 3.1% y 5.8%, respectivamente, con una sensibilidad de 0.1 nmol nitritos/pocillo. El rango de referencia para nuestro laboratorio fue de 3.2 – 7.2 nmol/mL (mediana 5 nmol /mL).

Análisis estadístico:

Se realizaron los test de normalidad (Shapiro-Wilk y D’Agostino-Pearson omnibus tests) dando distinto de la distribución normal.

La mayoría de las variables estudiadas presentaron distribución no paramétrica.

Los resultados obtenidos fueron expresados como mediana (Me) y rangos (valor mínimo y máximo), siendo comparadas las medianas entre el grupo con EC y el testigo por medio del test de Mann-Whitney. Se estudió la correlación (Spearman test) entre las diferentes variables analizadas. Por medio del test exacto de Fisher se evaluó si existe asociación entre la presión arterial, UPC y el índice de resistencia de la arteria renal, calculándose el Odds ratio (OR) (Software GraphPad 5, USA). Se consideró significativo $P < 0.05$.

7.2. Experiencia 2: “Terapia renoprotectora e hipotensora”

Población de estudio:

Perros con EC diagnosticado de la misma forma que en la Experiencia 1.

**Proceso de selección y exclusión:*

Perros con diagnóstico de EC, natural y no inducido, obtenidos de la Unidad de Endocrinología del Hospital Escuela FCV-UBA, según se fueron presentando a la consulta de la especialidad. El diagnóstico de EC se realizó igual a la experiencia 1.

Fueron excluidos del estudio los perros mayores de 13 años y aquellos que presentaron enfermedades concurrentes, infecciosas u orgánicas (en particular cardiopatías) que pudieran afectar la función renal.

A todos los perros se les indicó el mismo tratamiento para el control de la EC utilizado en nuestra institución, consistente en suministrar una combinación de Cabergolina 0,07mg/kg/semana y ácido retinoico (isotretinoína 9-cis) 2 mg/kg/día (Castillo et al., 2006, 2008).

Formación de grupos de estudio

Los mismos fueron divididos en 2 grupos (n=12 por cada grupo) según el UPC sea menor de 0,5 (negativos e inespecífico) o mayor de 0,5 (positivos).

Los perros con proteinurias positivas fueron a su vez subdivididos al azar en 2 subgrupos de 6 animales cada uno, según el tratamiento renoprotector e hipotensor que se indicó, con el propósito de evaluar cuál era el más efectivo en controlar la proteinuria y la presión arterial, sistémica o local (IR de la arteria renal).

➤ **Grupo A** (n=6), recibieron enalapril oral (0,5 mg/kg cada 12 hs) como tratamiento ya conocido, actuando como control del otro grupo.

➤ **Grupo B** (n=6), doxazosina mesilato oral (0,5 mg/kg cada 12 o 24 horas).

El grupo de perros con proteinuria negativa o inespecífica también fueron subdivididos en 2 subgrupos de 6 animales cada uno, según su presión arterial o el índice de resistencia de la arteria renal esté normal o elevado.

➤ **Grupo C** (n=6), tensión arterial o índice de resistencia arterial elevada. Estos perros recibieron doxazosina mesilato oral (0,5 mg/kg cada 12 o 24 horas).

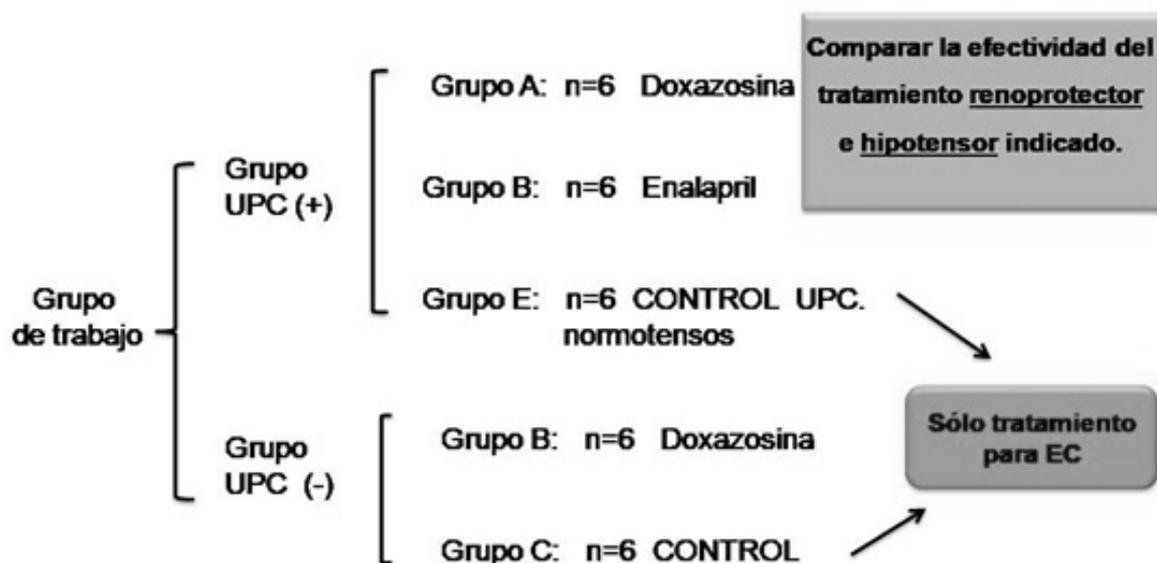
➤ **Grupo D** (n=6), grupo control, solo recibieron la terapéutica indicada para el tratamiento de la EC.

(Se consideran al menos 12 animales por grupo experimental debido a la falta de información previa que permita calcular el tamaño muestral y de las recomendaciones publicadas anteriormente por Julious, 2005 para estudios pilotos en investigación clínica.

Las dosis utilizada de enalapril fue la de uso de rutina en la clínica veterinaria diaria para reducir la presión arterial (Boswood, 2008) y de doxazosina (Alabaster, V & Davey, 1986), también se ha tenido en cuenta la posología de otros inhibidores α_1 -adrenérgicos usados en perros en enfermedades renales (S. Brown, Elliott, Francey, Polzin, & Vaden, 2013).

Se agrega otro grupo control o testigo, **Grupo E**, formado por perros con EC que presentaron UPC positiva pero son normotensos. Estos recibieron el tratamiento habitual de la EC. Sirve de control o testigo para comparar el efecto neto sobre la

proteinuria de los tratamientos renoprotectores probados, eliminando posibles efectos sobre proteinuria que podría ejercer el tratamiento de la EC. (Grupo E: UPC (+), normotensos n=6)



Se realizaron mediciones antes de iniciar el tratamiento y 3 meses después de haber sido comenzado para evaluar la capacidad en la disminución de proteinuria y de la presión arterial de los fármacos a comparar. Se midió: UPC y presión arterial.

Se han hecho análisis de rutina de los pacientes (control bioquímico por muestra de sangre) en el mismo periodo, que permitieron la incorporación de los mismos a los grupos de estudio (muestras basales) y que también sirvieron de referencia, y posteriores a modo de control del estado general.

El procedimiento de toma de muestras y análisis de parámetros, fue igual a lo detallado en la Experiencia 1.

El control de la evolución de los pacientes se hizo en base a la signología clínica y los análisis bioquímicos.

Los tratamientos instaurados son de por vida (ya que el tratamiento del cushing, aunque reduzca el cortisol, no elimina las comorbilidades instauradas).

Se realizó la comparación entre los efectos hipotensores de los 2 fármacos aplicados, como también, cual ejercía mejor efecto renoprotector, es decir, lograba reducir la proteinuria.

Para las comparaciones, se realizó la diferencia de cada variable medida, es decir, la diferencia entre la medición de parámetros final (a los 3 meses) menos la inicial, es decir: Delta UPC, Delta PS, Delta PD.

De esta forma los resultados se obtuvieron como valores numéricos “negativos” en su mayoría y los gráficos se representaron, por ende, hacia abajo evidenciado la “reducción” de dicho parámetro.

Análisis estadístico:

Se realizaron los test de normalidad (Shapiro-Wilk y D'Agostino-Pearson omnibus tests) dando distinto de la distribución normal.

La mayoría de las variables estudiadas presentaron distribución no paramétrica.

Los resultados obtenidos fueron expresados como mediana.

Las comparaciones de las medianas de a pares de grupos se realizaron por medio del test de Mann-Whitney.

Las comparaciones entre todos los grupos (A, B, C, D y E) se realizó por medio del test One-Way ANOVA (no paramétrico): Kruskal-Wallis Test y Dunns comparando todos los grupos.

Se graficaron las medianas en todos los casos. Software GraphPad 5, USA. Se consideró significativo $P < 0.05$.

7.3. Experiencia 3: “Estudio del estado de hipercoagulabilidad en perros con EC”

Población en estudio:

Perros con EC diagnosticados con el mismo procedimiento que en la experiencia 1.

A medida que fueron presentándose a consulta, se les realizó el diagnóstico explicado previamente; si cumplían con los parámetros de inclusión de las experiencias 1 y 2, eran incluidos a dichos estudios, y dentro de la extracción de sangre de muestras basales de bioquímica correspondientes, también se tomaba para las determinaciones de esta experiencia.

Las muestras de sangre fueron tomadas en ayunas de 12hs y recolectadas en tubos de plástico sin anticoagulante. Luego de la extracción de sangre se separó el suero por centrifugación y se congeló a -80°C hasta su procesamiento.

También se realizó extracción de sangre para las mismas determinaciones, a un grupo de perros sanos, grupo control o testigo (mismo grupo de la Experiencia 1).

**Determinaciones de bioquímica endócrina y citoquinas:*

Se determinaron las concentraciones de PAI-1 y FvW, por medio de kits comerciales de ELISA, ABCAM SimpleStep (ab184863 y ab189571 respectivamente), siguiendo las instrucciones del fabricante para su procedimiento.

Las concentraciones del FvW y PAI-1 fueron obtenidas a través de una curva estándar (siguiendo las instrucciones del fabricante). Para el FvW con un $R^2=0,93$ (P-valor $<0,0001$) y para el PAI-1 con un $R^2=0,97$ (P-valor $<0,0001$).

Luego se realizó la extrapolación y obtención de las concentraciones de los integrantes de cada grupo.

El DD se midió por el método de aglutinación en látex, por el Laboratorio del Hospital Escuela FCV-UBA, considerado para nuestro laboratorio: positivo > 200 (DD+). (Utilizando Kits comerciales y siguiendo sus instrucciones).

Actividad de AT III se midió como % de actividad en sangre por el Laboratorio del Hospital Escuela, considerando para nuestro laboratorio normal $> 80\%$. (Utilizando Kits comerciales y siguiendo sus instrucciones).

Se hicieron además, pruebas de coagulación de rutina diaria del laboratorio del Hospital Escuela (recuento de plaquetas, tiempo de tromboplastina parcial activada con caolín (KPTT), tiempo de protrombina (TP) y medición de fibrinógeno (F)).

Actividad de AT III y DD

Para estudiar la relación entre Actividad de AT III y DD, y la formación de trombos, se utilizaron muestras de 26 perros con EC.

El objetivo fue evaluar si la actividad de ATIII y el DD eran útiles como marcadores de riesgo de formación o presencia de trombosis con el propósito de establecer tratamiento adecuado o profilaxis.

A estos perros también se les realizó medición de presión arterial, evaluación de UPC y centellografía de perfusión pulmonar a los que manifestaban jadeo en reposo, aumento de frecuencia respiratoria, ecografía doppler.

➤ El análisis estadístico utilizado fue el Test exacto de Fisher calculándose el OR, especificidad y valor predictivo negativo. Se estudió la correlación entre las variables (Spearman test). Software GraphPad 5, USA. Siendo significativo $P<0,05$.

PAI-1, FvW y NO

Para estudiar las concentraciones presentes en sangre de PAI-1, FvW y NO, se realizó la comparación entre 12 perros sanos, grupo control o testigo, provenientes de caniles de FCV-UBA, (mismo grupo de la Experiencia 1) 6 de cada sexo, mediana de edad 6 años (rango 3-10 años) y 12 perros con EC diagnosticado (7 hembras y 5 machos), mediana de edad 9,3 años (rango 6-13 años).

El objetivo fue analizar las concentraciones del FvW y PAI-1 y compararlas entre los perro con EC y el grupo de animales sanos y si existía correlacion con las concentraciones de NO.

➤ Los resultados se expresaron como promedio \pm SEM, comparando los promedios por medio del test t de muestras no pareadas.

El FvW y PAI-1 se correlacionaron (test de Pearson) con el NO (Software GraphPad 5, USA). Se consideró significativo $P < 0,05$.

7.4. Experiencia 4: “Evaluación de niveles de Angiotensina II y Aldosterona”

Para evaluar los niveles de estas hormonas se realizó la comparación entre perros con EC diagnosticado (ídem experiencia 1 y 2) y un grupo de perros sanos, grupo control o testigo de caniles de la FCV-UBA.

Se tomaron muestra de sangre de 20 perros con EC que vinieron a consulta (mismo procedimiento que en experiencia 3) y de los 12 perros sanos de mismo grupo testigo que en la Experiencia 1.

Las muestras de sangre fueron tomadas en ayunas de 12hs y recolectadas en tubos de plástico sin anticoagulante para medir aldosterona y en tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para Ang II. Luego de la extracción de sangre se separó el suero por centrifugación y se congeló a -80°C hasta su procesamiento.

Se realizaron las mediciones de aldosterona y Ang II por medio de kits comerciales de ELISA, ABCAM (ab136933 y ab108796 respectivamente), siguiendo instrucciones del fabricante.

Las concentraciones de aldosterona y Ang II fueron obtenidas a partir de una curva estándar y siguiendo instrucciones del fabricante. Para aldosterona con un $R^2 = 0,97$ (P-valor $< 0,0001$) y para Ang II con un $R^2 = 0,99$ (P-valor $< 0,0001$).

Luego se realizó la extrapolación y obtención de las concentraciones de los integrantes de cada grupo.

Se realizaron los test de normalidad (Shapiro-Wilk y D'Agostino-Pearson omnibus tests) dando distinto de la distribución normal.

Las variables estudiadas presentaron distribución no paramétrica.

Los resultados obtenidos fueron expresados como mediana.

Las comparaciones entre las medianas de los grupos testigos y cushing se realizaron por medio del test de Mann-Whitney.

Se intentaron correlacionar entre sí y con PD y PS (test de Pearson).

Software GraphPad 5, USA. Se consideró para todo significativo $P < 0,05$.

RESULTADOS

8. RESULTADOS

8.1. Resultados de la Experiencia 1

8.1.1. Presión Arterial e Índice de resistencia de la arteria renal:

El 80% (16/20) de los perros estudiados presentaron hipertensión diastólica, estando en 4/20 (20%) dicha presión <90 mmHg. La PS fue elevada (hipertensión sistólica) en 12/20 animales (60%), siendo <160 mmHg en el resto (8/20, 40%). Todos los perros con PS elevada coincidieron con los que también tuvieron elevada la PD, mientras que de los 8 casos con PS normal, 5 tenían la PD elevada. Los valores de ambas presiones fueron significativamente más altas en el grupo de perros con EC respecto a los testigos ($P=0.004$ y $P=0.002$, PS y PD respectivamente) (Fig. 22).

El IR de la arteria renal izquierda ($Me= 0.68$, rango 0.5-.091) fue elevado en 8/20 casos (40%) y el de la arteria renal derecha ($Me= 0.71$, rango 0.57-0.93) en 10/20 (50%), sin haber diferencias significativas entre ambas. En el grupo control el IR fue <0.70 en ambas arterias renales ($Me= 0.5$, rango 0.35-0.6) habiendo diferencias significativas con el grupo con EC-PD ($P<0.001$).

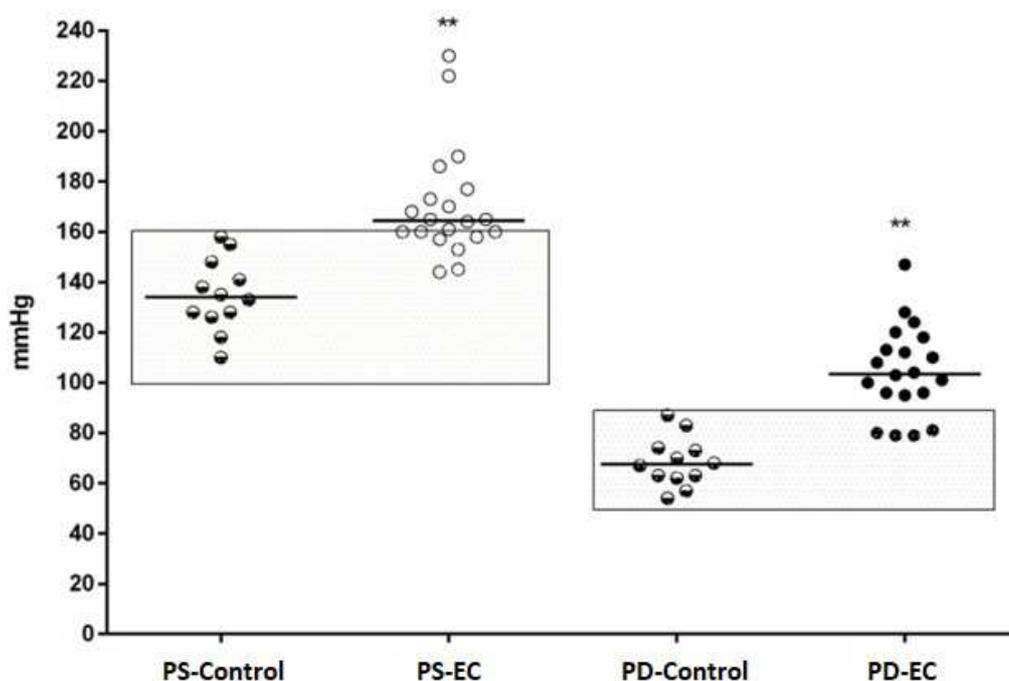


Fig. 22. PS y PD en perros controles y con EC.

Referencia: Circulo negro: PD en perro con EC, Circulo blanco: PS en perro con EC, Circulo con ambos colores: perros controles. El recuadro indica el área de PS y PD normal. La línea entera es la mediana, cada punto representa un perro evaluado. PS: $**P=0.004$, vs controles y PD: $** P=0.002$ vs controles. Ambas presiones más elevadas en perros con EC. (Adaptado de Vidal et al. 2018).

8.1.2. Radio-renograma excretor:

Ningún perro presentó deterioro severo de la función renal, si bien se pudo apreciar en 4/20 (25%) disminución de la masa renal (3 del izquierdo y uno del derecho), coincidiendo con lo que tendrían afectado el GFT y RT (Fig. 23).

El GFT (Fig. 24) fue entre 1.2 y 2.7 ml/kg/min en 7/20 perros (35%), siendo > 3 ml/kg/min (normal) en 13/20 perros (65%). El RT (Fig. 24) estuvo alterado (>3.5 y <5 minutos) en 7/20 perros (35%), coincidiendo con aquellos en que el GFT también lo estaba. No hubo diferencias entre el RT del riñón izquierdo y derecho. Según el análisis de las curvas del radio-renograma, se vieron afectadas las fases de filtración glomerular y de perfusión renal, estando la fase de excreción normal.

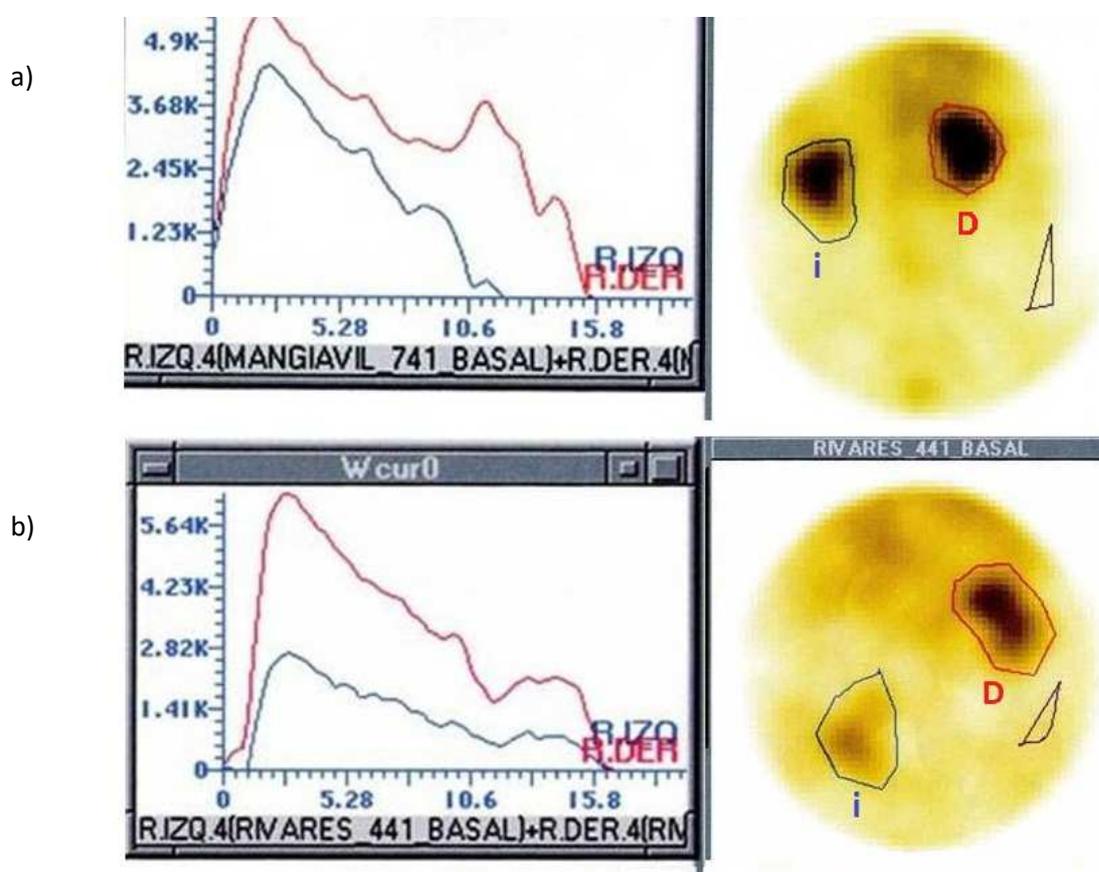


Fig. 23. Radio-renograma excretor y Centellografía en cámara gamma en dos perros con EC.

Las imágenes del lado izquierdo corresponden al radio-renograma y la de la derecha a la centellografía. A) Estudio dentro de los parámetros normales. En la figura de la derecha se observan ambos riñones con igual masa funcional a la captación del radiotrazador. En la figura de la izquierda se observan las curvas de filtración (GFT), pasaje y excreción, siendo ambas parecidas en los tiempos evaluados y el RT semejante (pico de la curva). B) Estudio de un perro con la función renal afectada. Se observa que el riñón izquierdo tiene una menor masa funcional (menor captación al radiotrazador) y la curva de filtración y RT son menores a la del riñón derecho. (Adaptado de Vidal et al. 2018).

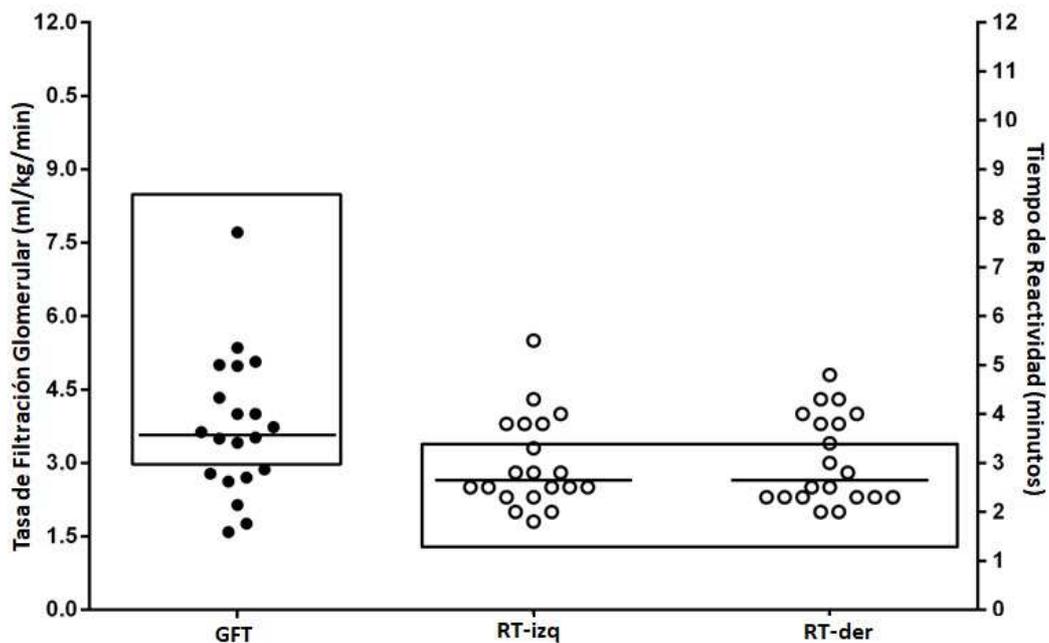


Fig. 24. Tasa de filtración glomerular total (GFT) y tiempo de reactividad (RT) en perros con EC.
Circulo blanco: PS. Circulo negro: PD. El recuadro indica el área de normalidad para el GFT y el RT. La línea entera es la mediana y cada círculo es un paciente evaluado. (Adaptado Vidal et al. 2018).

8.1.3. Estudio bioquímicos en suero:

La urea y creatinina, proteínas totales y albúmina en suero se encontraron dentro de los valores de referencia para el laboratorio en todos los casos (Tabla 1) y sin haber diferencia significativa con el grupo testigo.

Las concentraciones del cortisol sérico (Tabla 1 y Fig.25) fueron significativamente elevadas ($P < 0.0001$) en los perros con EC. Por el contrario, las concentraciones de NO *nit/nit* (Tabla 1 y Fig.25) se hallaron significativamente disminuidas ($P < 0.0001$) en los animales con EC.

8.1.4. Orina:

La densidad urinaria (Tabla 1) fue significativamente menor ($P < 0.05$) en el grupo EC respecto al testigo, siendo la densidad urinaria < 1025 en 12/20 perros (60%) y mayor de éste valor en el 40% restante. Los 20 perros tenían poliuria-polidipsia al momento del estudio. En el grupo testigo la densidad urinaria fue > 1025 en los 12 perros estudiados. El resto del estudio físico-químico no presentó alteraciones en ambos grupos.

La UPC (Tabla 1) fue significativamente mayor en el grupo EC respecto al testigo ($P < 0.0001$), siendo la UPC elevada (> 0.5) en 11/20 perros (55%), en rango inespecífico en 2/20 (10%) y menor de 0.3 en 7/20 perro (35%). Presentaron proteinuria glomerular 13/20 (65%) perros, coincidiendo con aquellos con UPC elevada o inespecífica. Ningún caso presentó proteinuria de origen tubular. En el grupo testigo la UPC fue < 0.3 y sin evidencia de proteinuria en los 12 casos.

Tabla 1. Densidad urinaria, urea, creatinina y UPC, cortisol y NO nit/nit valores de controles y perros con EC.

	EC	Control	P
Urea (mg/dL)	37 (20-60)	42 (30-57)	NS
Creatinina (mg/dL)	0.77 (0.5-1.2)	0.69 (0.4-0.9)	NS
Proteínas Totales (g/L)	6.8 (5.7-7.3)	7.1 (5.6-7.2)	NS
Albumina (g/L)	3.2 (2.8-3.3)	3.1 (2.9-3.3)	NS
Densidad Urinaria	1,014 (1,005-1,038) *	1,027 (1,022-1,035)	< 0.05
UPC	0.95 (0.11-5.8) ***	0.19 (0.1-0.28)	< 0.0001
Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	5.6 (2.8-10.6) ***	2.1 (0.8-4.5)	< 0.0001
NO nit/nit (nmol/mL)	1.54 (0.04-3.7) ***	5 (3.2-7.2)	< 0.0001

Valores expresados como medianas y rangos (mínimo y máximo).

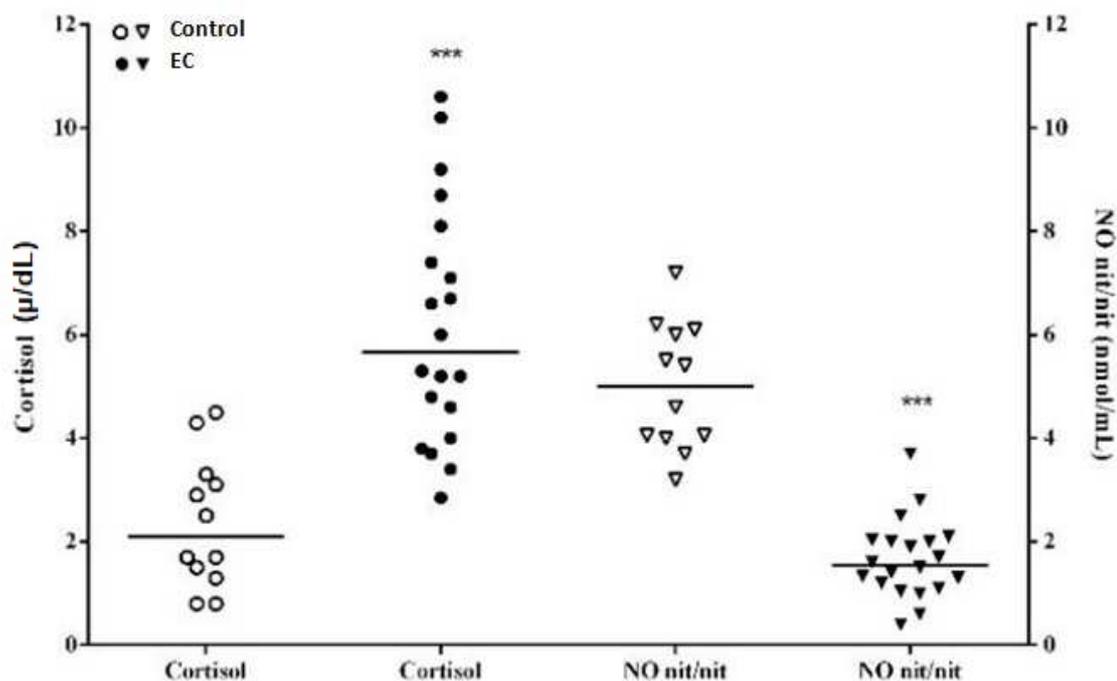


Fig. 25. Concentraciones de cortisol plasmático y NO *nit/nit* en los perros control y con EC.

Cada círculo representa un perro, círculo y triángulo blanco: controles, círculo y triángulo negro: EC; la línea entera representa la mediana. *** $P < 0.0001$ EC vs el control. (Adaptado Vidal et al. 2018).

Análisis de correlación y asociación

El cortisol sérico y el NO *nit/nit* (Fig. 26) correlacionaron significativamente y en forma inversa ($r = -0.67$; $P < 0.0001$).

La PS correlacionó con el cortisol ($r = 0.46$; $P = 0.008$) positivamente y en forma negativa con el NO ($r = -0.87$; $P < 0.0001$) (Fig. 27). No se halló correlación ($r = 0.3$; $P = 0.2$) ni asociación ($P = 1.00$) entre la PS con la UPC. Tampoco se halló correlación entre la PS, el IR de la arteria renal ($r = -0.05$; $P = 0.6$) y el GFT ($r = -0.32$; $P = 0.16$).

La PD correlacionó con el cortisol plasmático ($r = 0.63$; $P < 0.0001$) de forma positiva y con el NO *nit/nit* ($r = -0.81$; $P < 0.0001$) de forma inversa (Fig. 27). También se halló correlación con la UPC ($r = 0.8$; $P < 0.001$) (Fig. 28), habiendo una asociación significativa ($P < 0.05$) entre la presencia de proteína urinaria y la elevación de la PD, siendo el OR de 0.08 (95%CI: 0.01-0.63). No hubo correlación significativa entre la PD y el IR de la arteria renal ($r = 0.35$; $P = 0.16$). Si hubo correlación entre la PD con el GFT ($r = -0.58$; $P = 0.007$) de forma negativa (Fig. 28).

El IR correlacionó (Fig.29) positivamente con el cortisol sérico ($r=0.69$; $P=0.0007$) y en forma negativa con el NO *nit/nit* ($r = -0.53$, $P= 0.014$). En 10/20 perros coincidieron el aumento del IR y de la PD pero sin haber asociación estadística significativa entre ambas ($P=0.36$). Con respecto a la PS, en 8/20 (40%) perros coincidieron en tener ambos parámetros afectados pero tampoco dicha asociación fue significativa ($P=0.36$). No se halló correlación significativa entre el IR y UPC ($r=0.2$; $P=0.8$), pero sí ambas variables presentaron asociación estadística ($P<0.01$), encontrándose que tanto los 13 perros con $UPC>0.5$ como los 2 perros con los valores considerados inespecíficos tuvieron el $IR>0.7$, siendo el OR de 0.017 (95% CI: 0.001-0,41). Con el GFT no se halló correlación ($r=-0.34$; $P=0.14$).

Finalmente, el GFT no presentó correlación con el cortisol ($r=-0.16$; $P=0.5$), habiendo correlación con el NO *nit/nit* ($r = 0.54$; $P=0.004$).

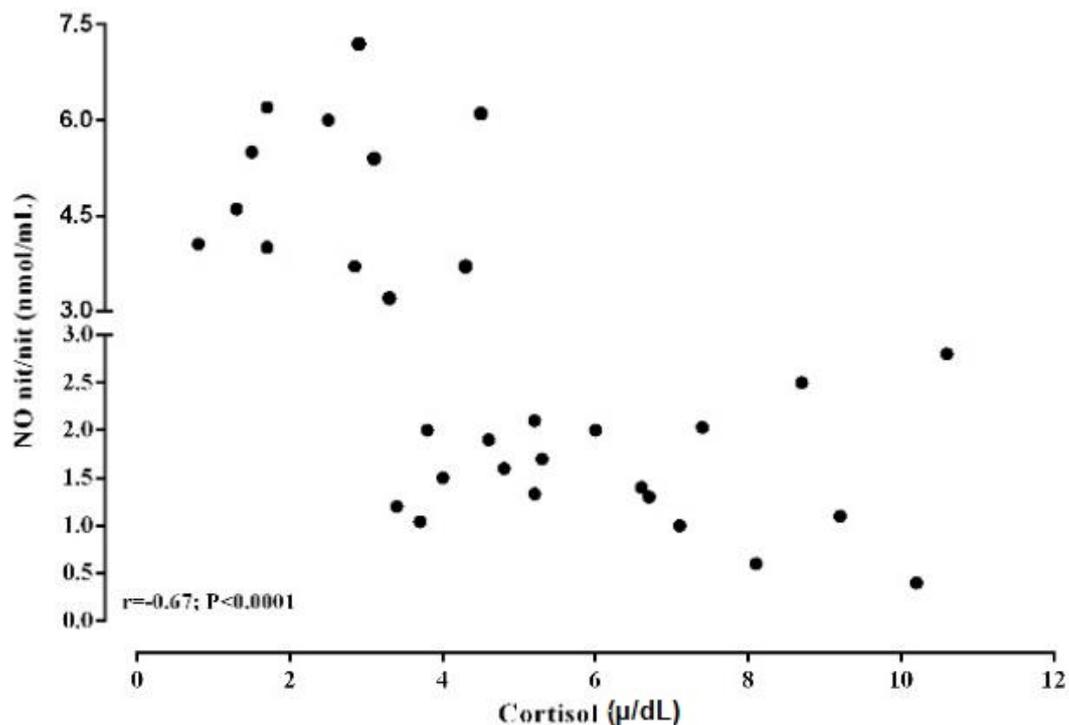


Fig. 26. Correlación entre el NO *nit/nit* y el cortisol plasmático.

Los 12 perros controles tienen los valores más altos de NO *nit/nit* (cuadrante superior izquierdo) para luego descender conforme se incrementan las concentraciones del cortisol. (Adaptado Vidal et al. 2018).

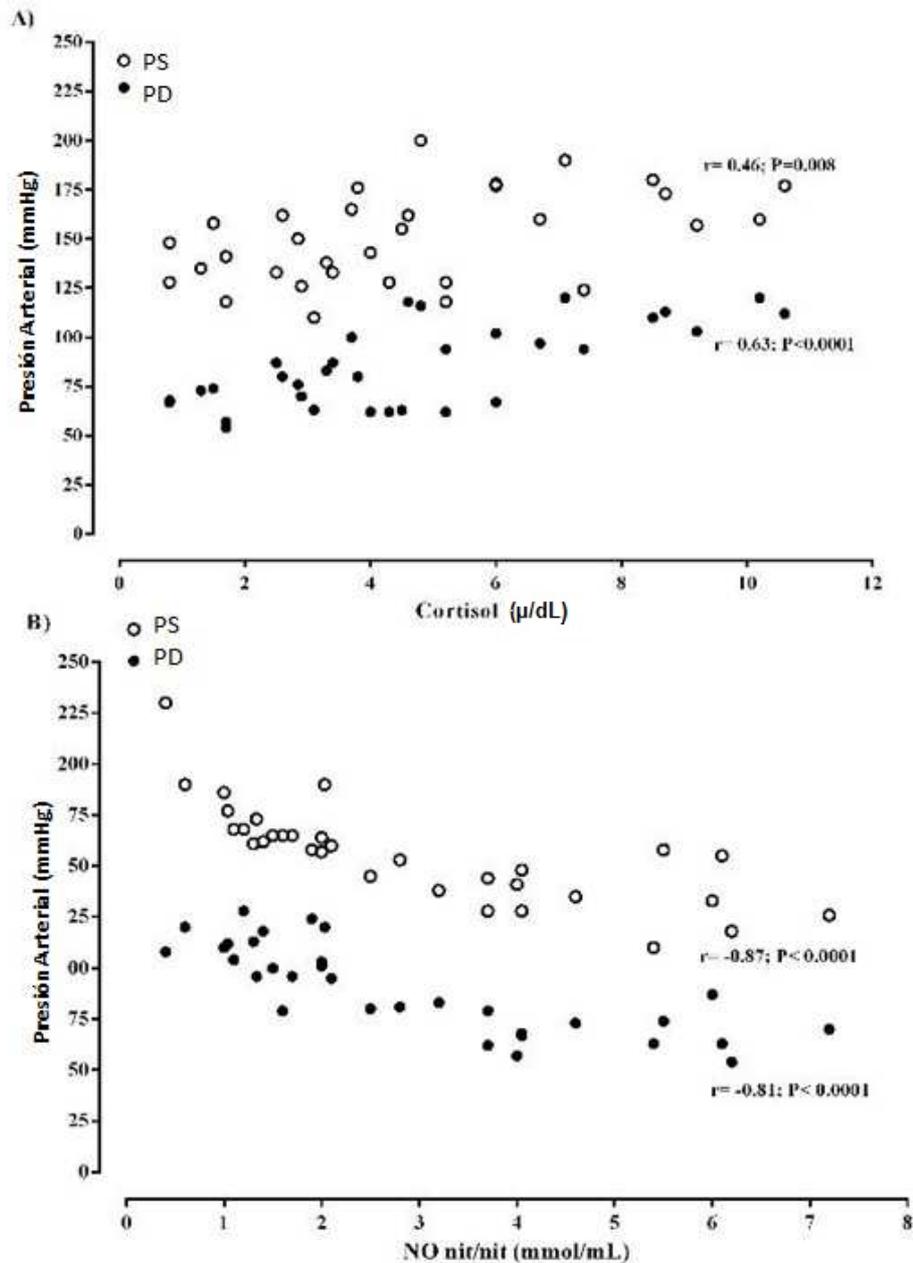


Fig. 27. Correlación entre las PS y PD con el cortisol plasmático (A) y el NO *nit/nit* (B).

Se puede apreciar que la PD es la más afectada por las concentraciones del cortisol (A), contrariamente a lo que sucede con el NO *nit/nit* (B) donde ambas presiones son afectadas de manera similar. (Adaptado Vidal et al. 2018).

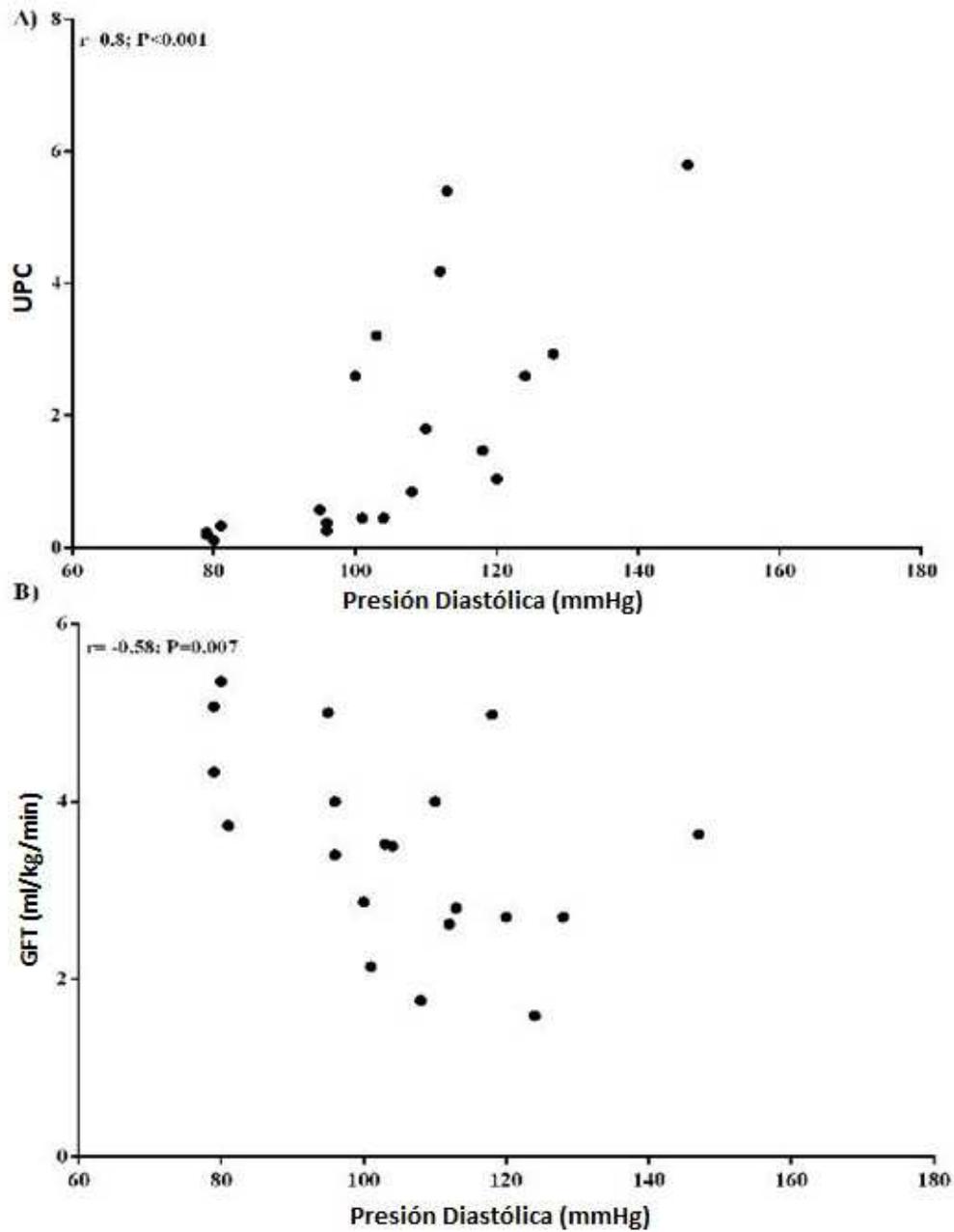


Fig. 28. Correlación entre la UPC (A) y GFT (B) con la PD.

Se puede apreciar que la mayor presencia de proteína en orina en el EC coincide con valores elevados de la PD (A). También la GFT se verá afectada por la PD (B), aunque en menor medida dado el valor de la correlación. (Adaptado Vidal et al. 2018).

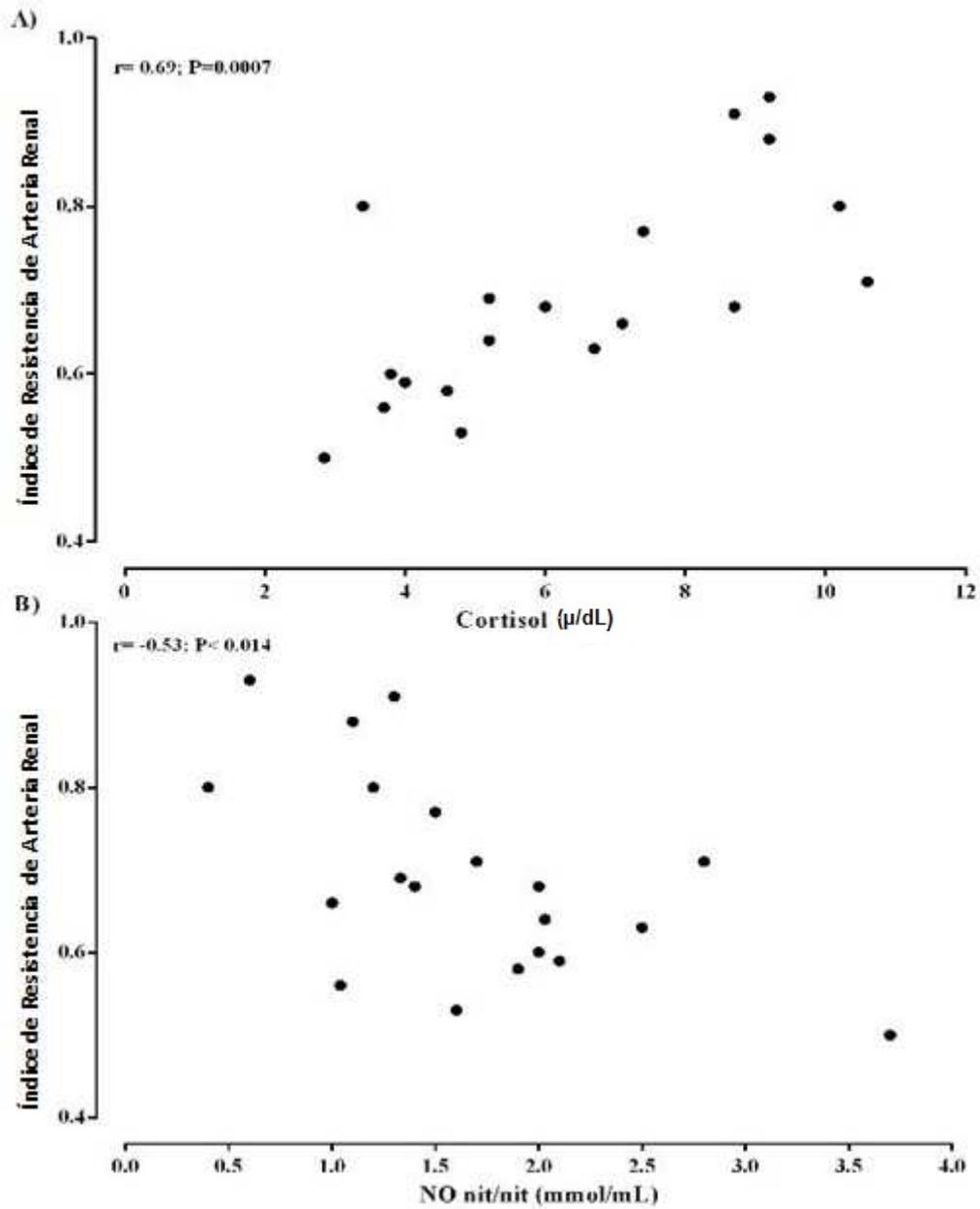


Fig. 29. Correlación entre el IR vs. cortisol plasmático (A) y el NO *nit/nit* (B).

La alteración en éste índice en EC está influenciado por las concentraciones de cortisol principalmente (A) y en menor medida por el NO (B) según arrojó el valor de la correlación. (Adaptado Vidal et al. 2018).

8.2. Resultados de la Experiencia 2

8.2.1. Efecto renoprotector:

➤ Respecto al **UPC**, entre los Grupos A y B, se vio que no hubo diferencias significativas en la disminución del UPC entre los tratamiento con Enalapril como con Doxazosina mesilato, respectivamente, comparándolos entre sí. Se analizó la diferencia, es decir: Delta UPC: UPC final – UPC inicial (con 3 meses de tratamiento). $P\text{-valor}_{A \text{ vs } D} = 0,58$. (Grupo A: -2,22 y Grupo B: -2,5). (Fig. 30).

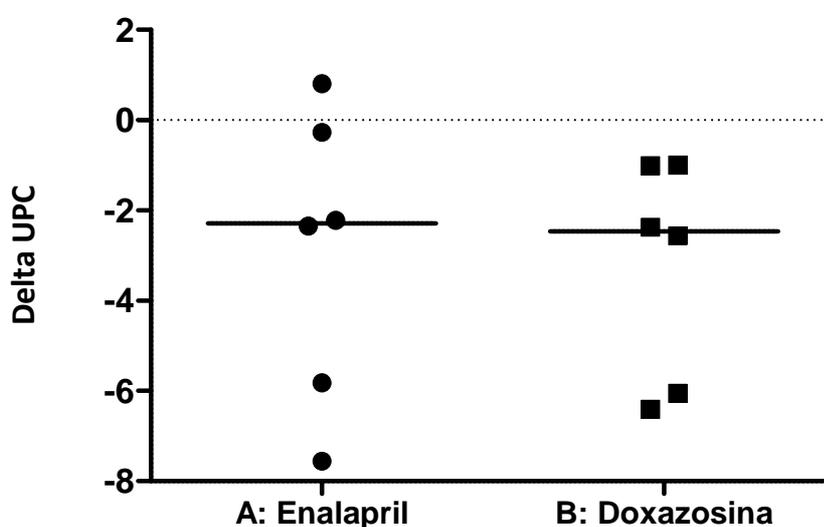


Fig. 30. Delta UPC entre los grupo A (enalapril) y grupo B (doxazosina).

Cada circulo/cuadraro representa un perro. La línea representa la mediana.

Si bien no hubo diferencias entre sí en los tratamientos de los grupos A y B, si se encontró con el Grupo control D (UPC -), es decir, que ambos tienen efecto en reducir proteinuria:

Grupo A vs D: (-2,22 y -0,01) **P-valor**_{A vs D} = **0,03** y

Grupo B vs D: (-2,5 y -0,01) **P-valor**_{B vs D} = **0,005**. (Fig. 31)

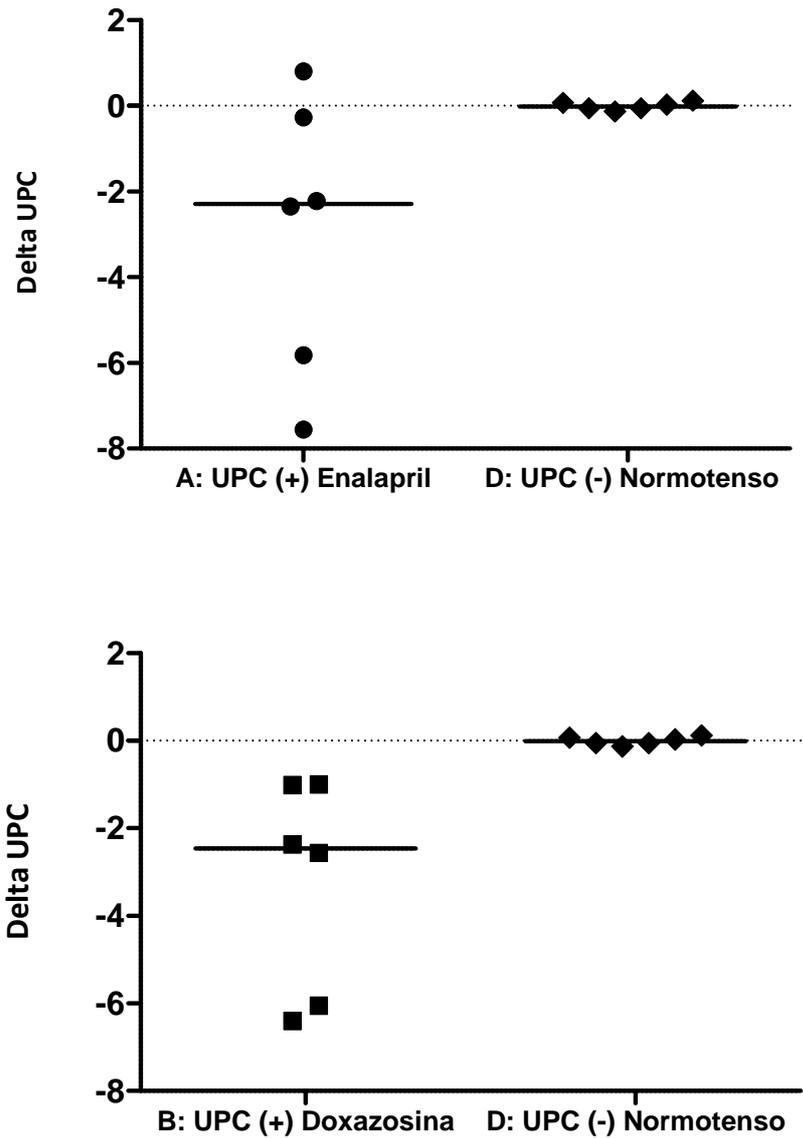


Fig. 31. Delta UPC entre grupos A(a) y B(b) vs D.

Cada circulo/cuadrado/rombo representa un perro. La línea representa la mediana. A) Delta entre A vs D, *P-valor= 0,03. B) Delta entre B vs D, **P-valor= 0,005.

Pero comparando los tratamientos de los Grupos A y B, contra el Grupo E (UPC + Normotenso), se vio que sólo hubo diferencia significativa, con el Grupo B:

P-valor_{B vs E} = 0,01 (Grupo B: -2,5 vs Grupo E: -0,05)

no con el Grupo A: P-valor_{A vs E} = 0,14.

Se podría decir que, si bien ambos fármacos tienen un efecto renoprotector, ya que colaboran en la disminución del UPC, sería más efectiva la Doxazosina, respecto al Enalapril. Se grafican las medianas (Fig. 32.)

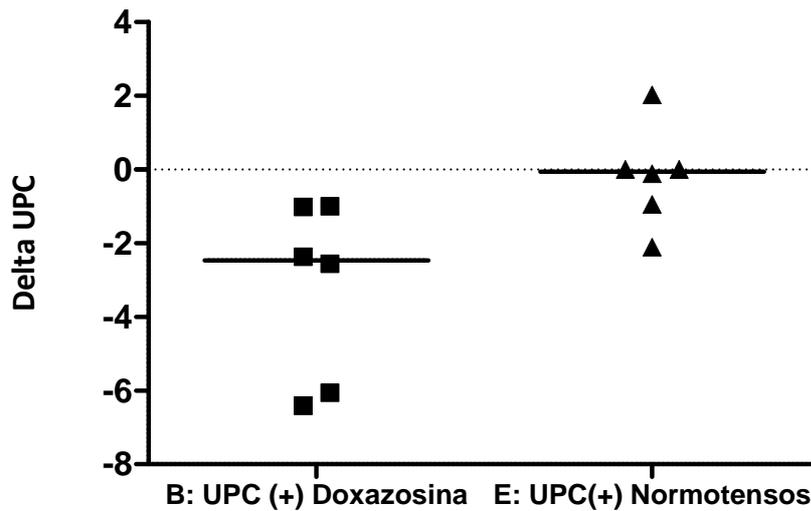


Fig. 32. Delta UPC entre grupo B vs E.

Cada cuadrado/triángulo representa un perro. La línea representa la mediana. Hay diferencia significativa con doxazosina (grupo B). *P-valor= 0,01.

8.2.2. Efecto Hipotensor:

➤ Respecto a la **PS**, se analizó la diferencia (Delta PS), se vio que no hubo diferencias significativas para disminuir la PS entre los grupos A y B:

[A: -19 vs B:-18,5) P-valor_{A vs B}= 0,87.

Tampoco comparando todos los grupos entre sí: P-valor_{A,B,C,D,E}= 0,09.

Excepto por separado y comparando cada grupo con grupo D y E. Se vio entonces que solo hubo diferencia entre el Grupo B vs Grupo D, y el B vs E:

B vs D: (B:-18,5 y D: 6) **P-valor_{B vs D}= 0,03**

B vs E: (B:-18,5 y E:-1,5) **P-valor_{B vs E}= 0,01.**

No hubo diferencias entre: Grupo A vs D: P-valor_{A vs D}= 0,1; y tampoco A vs C (C: -4) P-valor_{C vs D}= 0,8.

Por lo tanto, la más efectiva para reducir PS sería la Doxazosina. (Fig. 33)

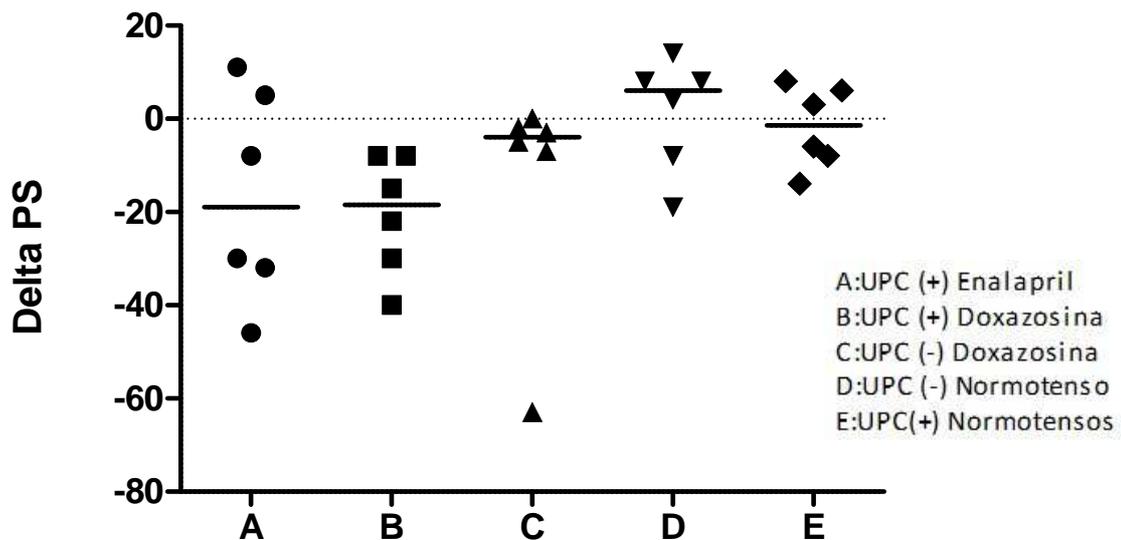


Fig. 33. Delta PS entre Grupos A, B, C, D y E.

Cada figura del grafico represente un animal. La línea representa la mediana. Solo hubo diferencias significativas comparando grupo B vs D: P-valor= 0,03, y con B vs E: P-valor= 0,01.

➤ Respecto a la **PD**, hubo diferencias comparando todos los grupos entre sí

P-valor_{A,B,C,D,E} = 0,001.

Comparando de a pares, se vio diferencias entre los tratamientos del:

Grupo A vs B (A: -9 vs B: -37) **P-valor_{A vs B} = 0,037.**

Grupo A vs D (A: -9 D: 0,5) no hubo: P-valor_{A vs D} = 0,05

pero si entre A vs E (E: 1,5) **P-valor_{A vs E} = 0,04.**

Entre B vs D, y B vs E: B: -37 vs D: 1,5 ; E: 1,5)

si hubo diferencia significativa coincidiendo ambos con un **P-valor_{B vs D, B vs E} = 0,002.**

Y finalmente C vs E también dio diferencia significativa (C: -30)

P-valor_{C vs E} = 0,008.

Si bien ambos fármacos hipotensores son efectivos para reducir PD, se vio que entre ambos, sería más efectiva la Doxazosina para reducir la PD. (Fig.34.)

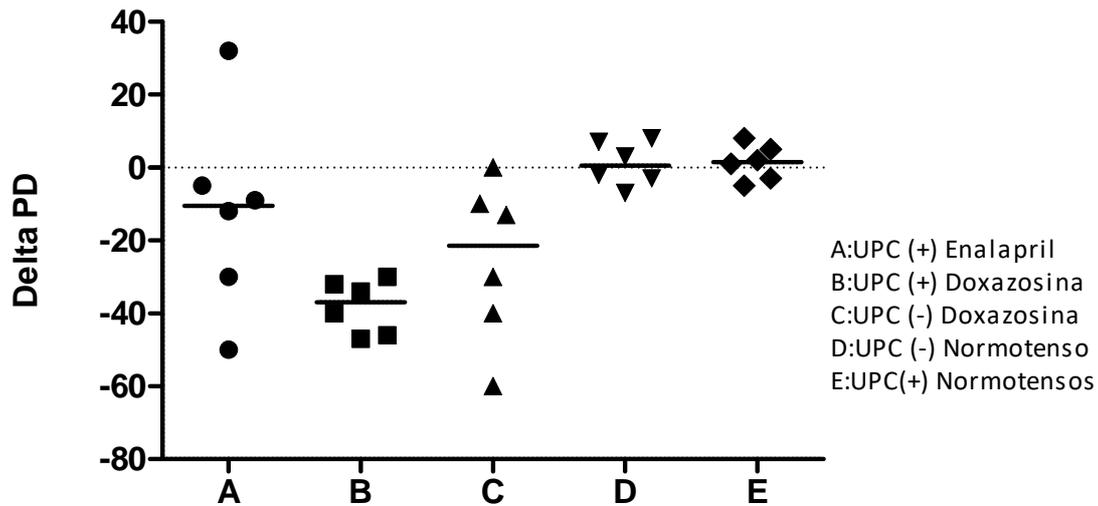


Fig. 34. Delta PD entre grupos A, B, C, D y E.

Las líneas representan las medianas. Hubo diferencia significativas entre los grupos: A vs B: P-valor= 0,037; entre A vs E: P-valor= 0,04; entre B vs D y B vs E: ***P-valor= 0,002; entre C vs E: **P-valor= 0,008.

Los valores de bioquímica general (urea, creatinina, albumina, proteínas, por ejemplo) estuvieron todos siempre, en ambas muestras, dentro del rango normal para la especie sin sufrir ningún tipo de modificación.

8.3. Resultados de la Experiencia 3

8.3.1. Actividad de AT III y DD:

Clínicamente 8/26 (30,8%) perros presentaron taquipnea en la consulta. La presión sistólica fue elevada en 9/26 (34,6%) y la diastólica en 14/26 (53,8%).

En 9/26 (34,6%) tanto la ATIII como el DD estuvieron alterados, habiendo asociación entre ambos (P-valor=0,002, OR: 0,04; 95%CI: 0,004-0,3) teniendo una correlación inversa ($r=-0,5$; P-valor=0,008) (Fig. 35).

La UPC fue elevada en 10/26 (38,5%), asociándose este evento con la menor actividad de ATIII (P-valor <0,001; OR:0,02; 95%CI: 0,001-0,4) (Fig. 36) y con el DD+ (P-valor=0,008, OR: 0,06; 95%CI: 0,008-0,4) (Fig. 37) correlacionando los valores de UPC con ATIII ($r=-0,75$; P-valor <0,001) y con DD ($r=0,67$; P-valor=0,004).

La presión sistólica y diastólica, no presentaron asociación ni correlación estadística con ATIII, DD y UPC.

El estudio de centellografía pulmonar evidenció TEP en 4/26 (15%) perros, correspondiendo a 4/8 (50%) con taquipnea y 4/9 (44,4%) con actividad disminuida de ATIII y DD+ respectivamente.

La actividad disminuida de ATIII y DD+ se asoció al TEP (P=0,04), con una especificidad de 0,26 (95%CI: 0,006-0,8) y un valor predictivo negativo de 0,17 (95%CI: 0,04-0,64) en ambos casos.

En los animales estudiados los test de coagulación y F no presentaron alteración.

En un caso con EC la actividad de la ATIII fue de 65% y DD+.

La ecografía doppler no mostró evidencias de tromboémbolos.

El recuento plaquetario, KPTT, TP y el F fueron normales.

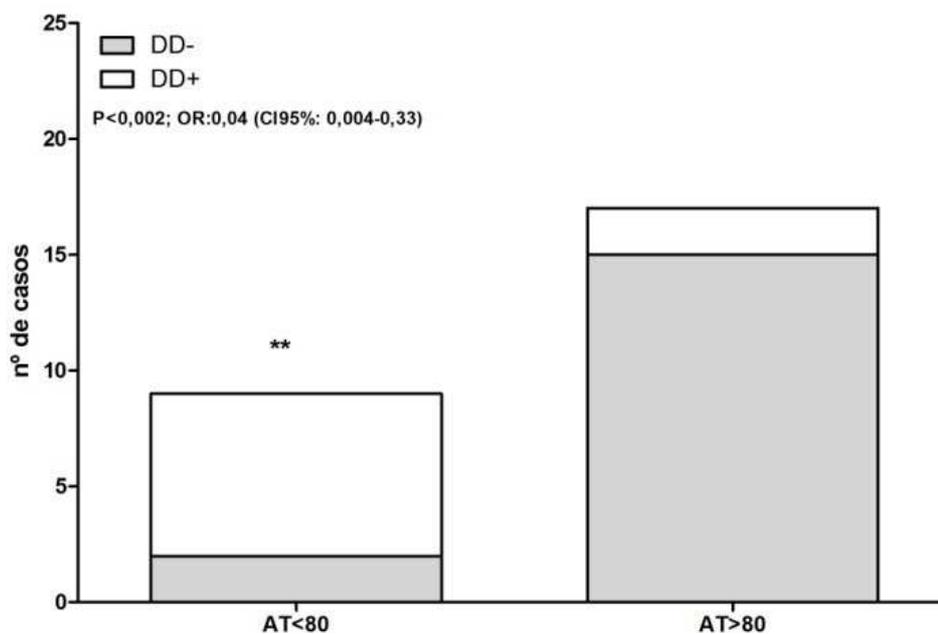


Fig. 35. Asociación entre DD y AT III.

El DD+ se asocia con menor actividad de AT III y un DD- se asocia con mayor actividad de AT III. Teniendo correlación inversa ($r=-0,5$; P-valor=0,008).

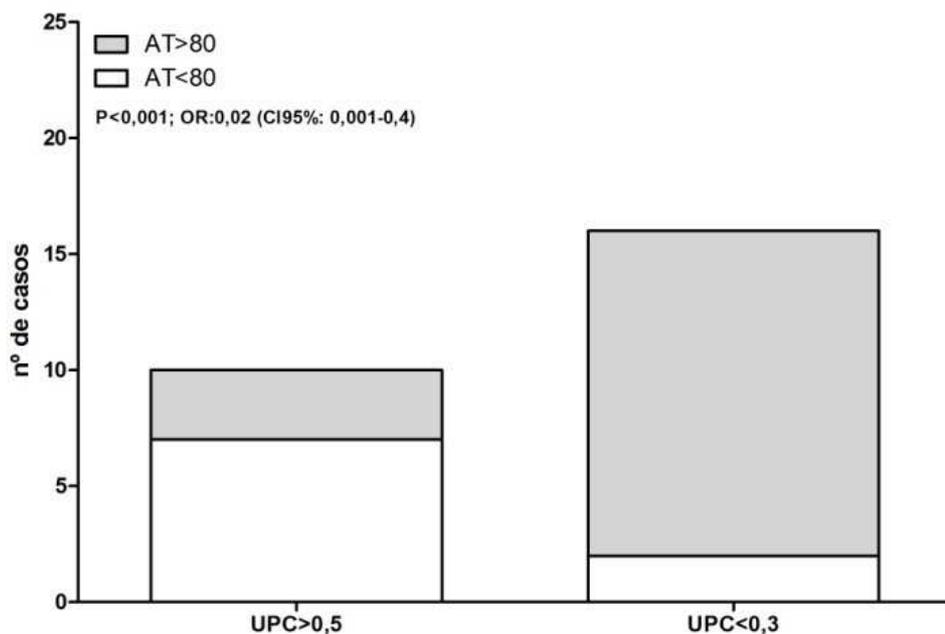


Fig. 36. Asociación entre AT III y UPC.

Una UPC patológica se asocia con una menor actividad de AT III, y una UPC normal se asocia con mayor actividad de AT III. Correlación inversa ($r=-0,75$; P-valor $<0,001$)

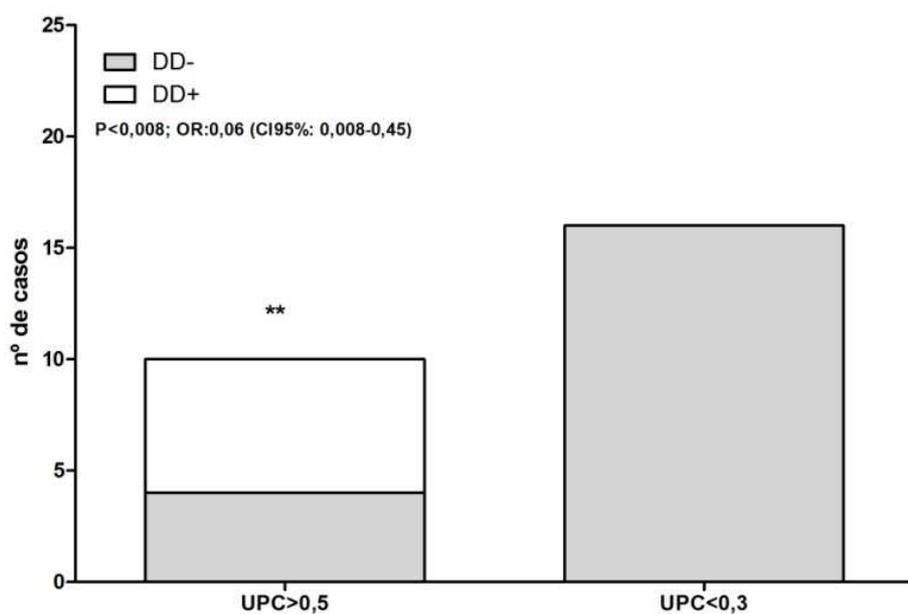


Fig. 37. Asociación entre UPC y DD.

Valores de UPC patológicos se asocian con DD+, y valores de UPC normales se asocian con DD-. Correlación positiva ($r=0,67$; P-valor= $0,004$).

8.3.2. PAI-1, FvW y NO:

Las concentraciones del FvW y PAI-1 (Fig. 38 y 39) fueron significativamente mayores en el grupo Cushing (EC) respecto del control o testigo (FvW: $4,2 \pm 0,3$ vs $2,7 \pm 0,3$ ng/ml, P-valor=0,003; PAI-1: $836,6 \pm 153,2$ vs $295,2 \pm 24,1$ pg/ml; P-valor=0,002).

Los valores del NO fueron significativamente más elevadas en los controles respecto del grupo EC ($5 \pm 0,3$ vs $1,7 \pm 0,2$; P-valor <0,0001) (Fig. 40).

Tanto el FvW como el PAI-1 correlacionaron (Fig. 41) inversamente con el NO (FvW: $r = -0,75$; P-valor <0,001; PAI-1: $-0,55$; P-valor=0,04).

El perro con actividad de ATIII 65% y DD+ coincidió con las concentraciones más altas del FvW y PAI-1.

Los 12 perros testigos fueron normotensos, mientras que 7/12 Cushing (EC) presentaron hipertensión arterial, coincidiendo con los valores más elevados de FvW y PAI-1.

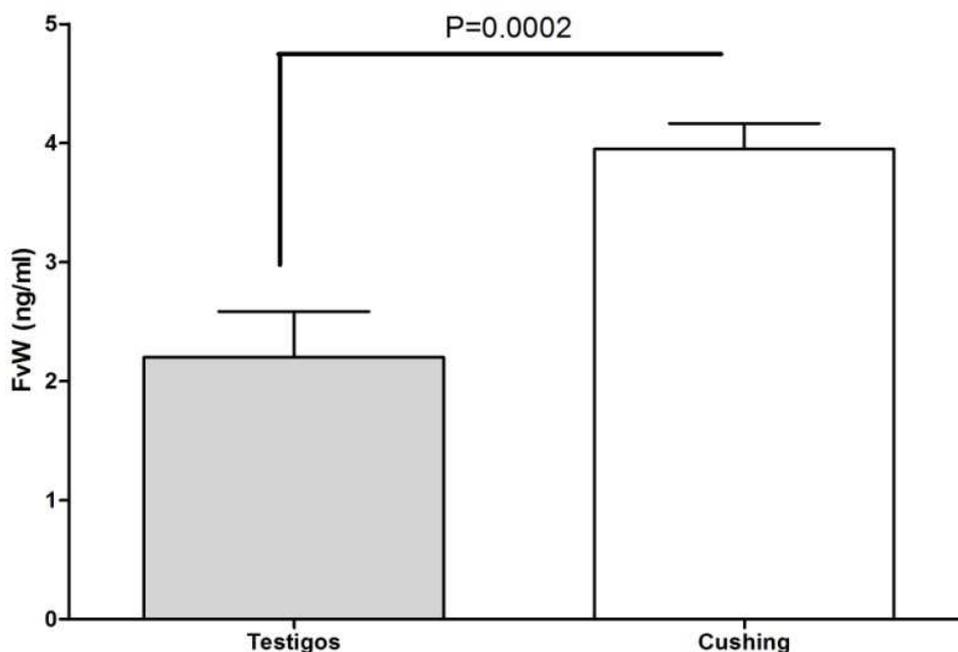


Fig. 38. Concentración de FvW entre testigos y cushing (EC).

Concentración significativamente mayor de FvW en el grupo de perros con EC respecto al grupo testigo o control. FvW: $4,2 \pm 0,3$ vs $2,7 \pm 0,3$ ng/ml, P-valor=0,003.

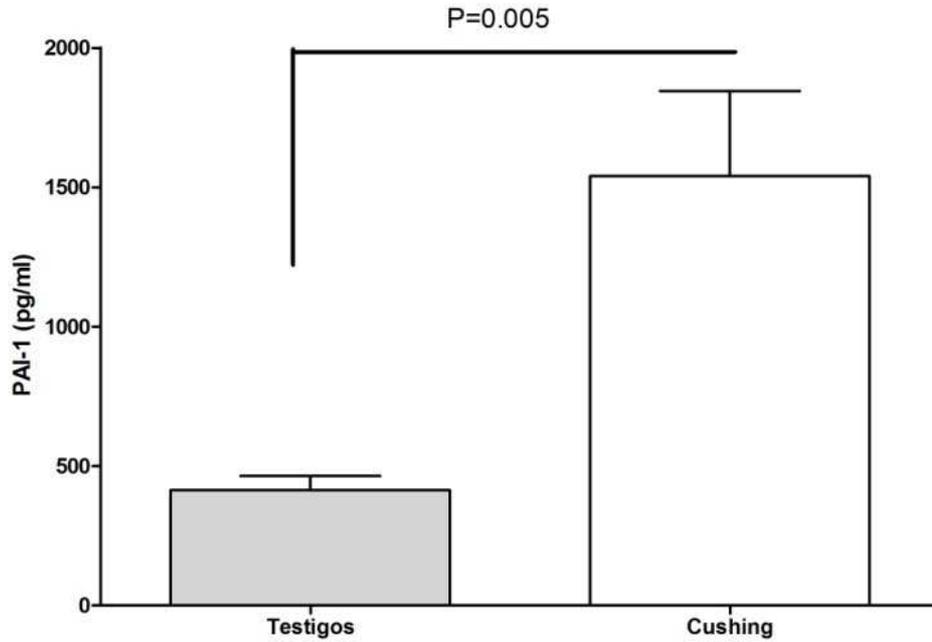


Fig. 39. Concentración de PAI-1 entre testigos y cushing (EC).

Concentración significativamente mayor de PAI-1 en grupo con EC respecto al grupo testigo o control. PAI-1: $836,6 \pm 153,2$ vs $295,2 \pm 24,1$ pg/ml; P-valor=0,002).

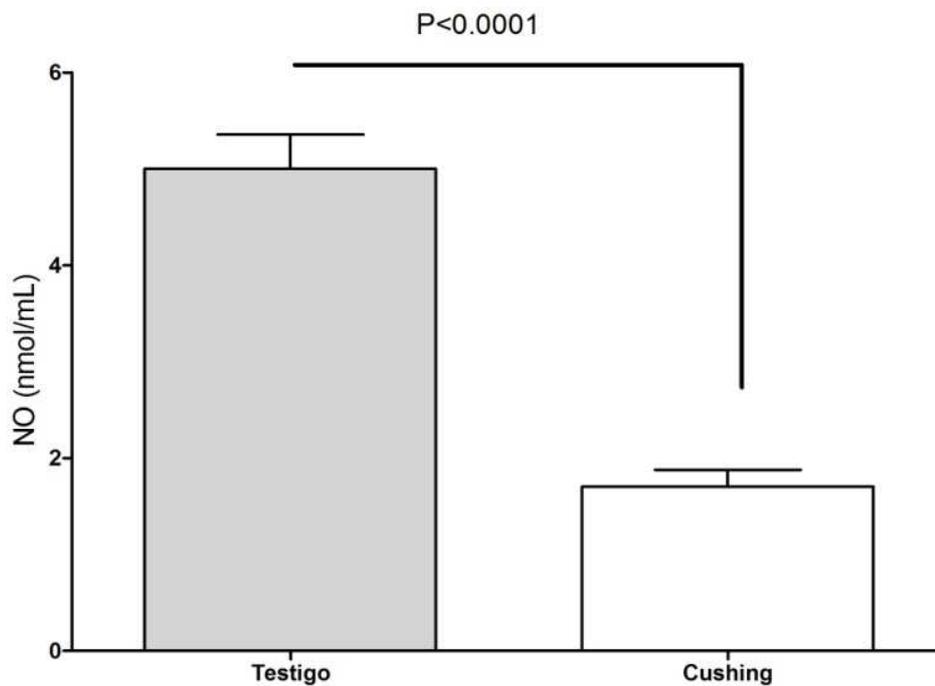


Fig. 40. Concentración de NO entre testigos y cushing (EC).

Concentración significativamente mayor de NO en grupo testigo o control respecto a grupo con EC. NO: $5 \pm 0,3$ vs $1,7 \pm 0,2$; P-valor <0,0001.

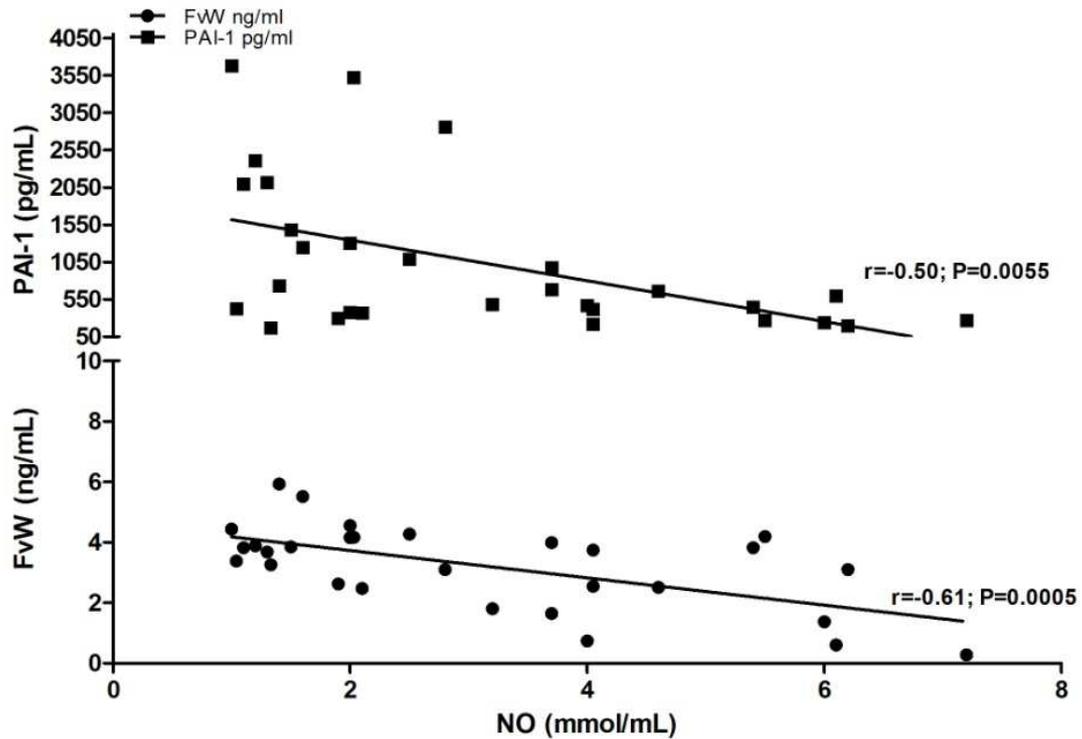


Fig. 41. Correlación entre PAI-1, FvW y NO.

Tanto el PAI-1 como el FvW correlacionan de forma inversa con el NO. (FvW: $r = -0,75$; P-valor $<0,001$; PAI-1: $-0,55$; P-valor $=0,04$).

8.4. Resultados de la Experiencia 4

8.4.1. Aldosterona:

Los resultados obtenidos de la *Aldosterona*, arrojaron que no hay diferencias significativas entre los controles o testigos sanos y los perros cushing (EC), siendo sus valores 5,22 pg/ml vs 5,12 pg/ml respectivamente, P-valor= 0,8. (Fig.42.)

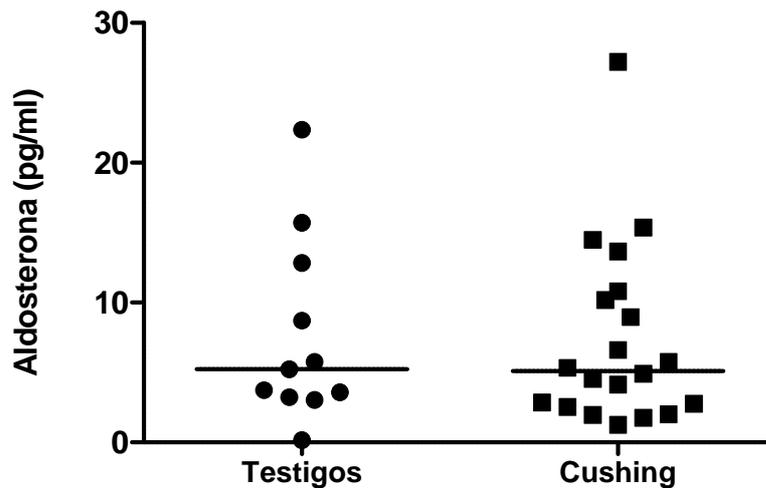


Fig. 42. Concentración de aldosterona en testigos vs cushing (EC).

Cada circulo/cuadrado es un perro. La línea representa la mediana. No hubo diferencias significativas entre perros sanos y con EC, sus valores respectivamente 5,22 pg/ml vs 5,12 pg/ml P-valor= 0,8.

8.4.2. Angiotensina II:

Los concentraciones de la *Angiotensina II* arrojaron diferencias significativas entre los testigos sanos y los perros que presentaban EC, siendo sus valores respectivamente: 0,05 ng/ml y 0,07 ng/ml con un P-valor< 0,0001. (Fig. 43)

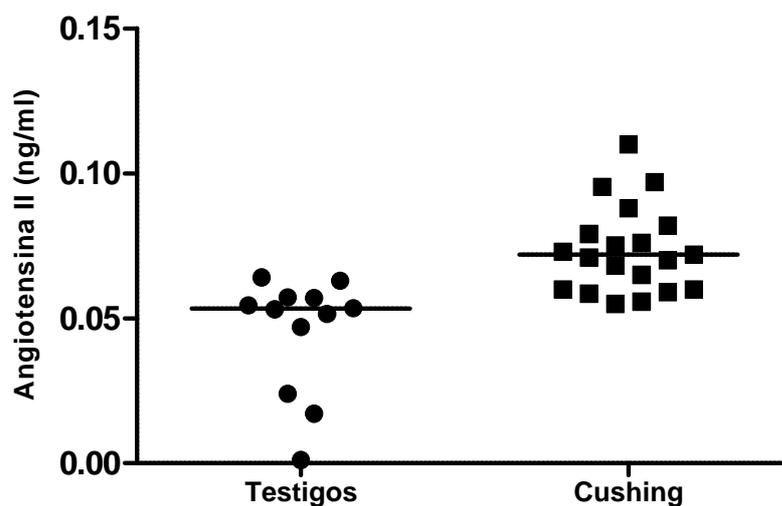


Fig. 43. Concentración de Ang II en testigos vs cushing (EC).

Cada circulo/cuadrado es un perro. La línea representa la mediana. Hubo diferencias significativas entre sanos y perros con EC, siendo sus valores respectivamente: 0,05 ng/ml y 0,07 ng/ml con un P-valor< 0,0001

Correlaciones:

Hasta el momento no se ha encontrado correlación entre las concentraciones de Aldosterona y Ang II (P-valor= 0,9 r= 0,01) ni entre las de aldosterona y PS: P-valor= 0,7 r=-0,1 y con PD: P-valor= 0,3 r=0,2; ni entre Ang II y PS: P-valor= 0,6 r=0,1 y para PD: P-valor= 0,6 r=-0,01.

DISCUSIÓN

9. DISCUSION

Recapitulando las hipótesis que llevaron al desarrollo de esta tesis, el objetivo fue tratar de responder a las mismas, que fueron:

- En caninos con EC habría aumentos en las concentraciones de Aldosterona y Ang II, y disminución de NO, provocando hipertensión y daño glomerular.
- La hipercoagulabilidad observada en la EC se relaciona con la proteinuria de origen glomerular y presión arterial, predisponiendo a la formación de tromboémbolos.
- El uso de inhibidores α -adrenérgicos sería útil para controlar la tensión arterial y lograría disminuir la proteinuria evitando el progreso hacia la IRC, siendo un efectivo renoprotector.

Para poder darle desarrollo a esta tesis se procedió a la elección de la población en estudio que fue perros con SC. Si bien en humanos, es una enfermedad de muy baja prevalencia y difícil de diagnosticar, en el perro es una de las endocrinopatías más frecuentes de la clínica veterinaria diaria, junto a la Diabetes Mellitus y al hipotiroidismo (Behrend, 2015). Se puntualizó en la EC porque corresponde al 85% de los casos de SC en perros.

Se presenta en mayor medida en perros de edad adulta a gerontes, aunque puede haber casos en perros jóvenes, de entre 2-5 años. No hay distinción de razas, ni preferencia por sexos, aunque hay estudios que demuestran cierta predisposición en hembras (Gallelli et al., 2010).

En esta tesis los animales estudiados corresponden a las características mencionadas, perros de diversas razas, machos, hembras, edad adulta a geronte, un caso de un animal joven Jack Russell macho entero de 4 años, con las variaciones correspondientes a todas estas particularidades, agregándose además otras dificultades, que tienen que ver con que dependen de sus propietarios para su alimentación, actividad física, administración de medicación, entre otras cosas.

La elección de esta especie se debe a que el perro es un excelente modelo de estudio del SC, por lo que los resultados obtenidos en esta especie tendrán un interesante potencial de transferencia para las investigaciones en medicina humana. A su vez, los resultados obtenidos se traducirán en un valioso aporte para el conocimiento de la fisiopatología del SC en el perro, además de que brindarán la posibilidad de optimizar el diagnóstico de varias de sus comorbilidades y la terapéutica de los pacientes afectados por dicha enfermedad.

Avocándonos a responder a las hipótesis, empezaré por la evaluación de los resultados obtenidos, de forma ordenada como fueron presentados en los apartados correspondientes a Materiales y Métodos y Resultados.

9.1. *Discusión resultados de Experiencia 1:*

Entre los efectos adversos o comorbilidades asociadas al hipercortisolismo crónico en la EC se encuentra la hipertensión y como consecuencia de esto, la disfunción glomerular con riesgo de desarrollar enfermedad renal.

Estos hallazgos se encuentran en concordancia a lo informado por varios autores, considerándose al SC como una de las causas de enfermedad renal en el perro, al afectarse específicamente el glomérulo desde el comienzo, presentando altos valores de proteinuria de origen glomerular (Martirena et al., 2007). Por otro lado, otros estudios indican que al momento del diagnóstico de SC, entre el 30 y 50% de los perros ya presentan proteinuria de tipo glomerular (Lien et al., 2010).

Estudios en medicina humana han demostrado que éstos efectos adversos son persistentes aún después de haberse normalizado las concentraciones de cortisol y controlado la enfermedad (Haentjens et al., 2005), coincidiendo con trabajos en perros (Barahona et al., 2009; Feelders et al., 2012; Martirena et al., 2007; P. M. Y. Smets, Lefebvre, Kooistra, et al., 2012), siendo importante su identificación precoz y así proceder con medidas profilácticas o terapéuticas adecuadas.

Primeramente es necesario analizar el comportamiento del NO en la EC, ya que actuaría como uno de los factores desencadenantes de la hipertensión y daño glomerular, junto y como consecuencia del exceso de cortisol. El NO, una de las sustancias vasodilatadoras más importantes (Endemann & Schiffrin, 2004), desciende a medida que aumentan las concentraciones de cortisol en sangre, debido a la inhibición de la eNOS y el transporte transmembrana de L-arginina, su precursor (Loscalzo, 1995; Magiakou et al., 2006; Yang & Zhang, 2004). Eventos ya comunicado previamente tanto en perros como en humanos con SC (Cabrera Blatter et al., 2012; Wen, Li, & Whitworth, 2000).

Por lo tanto el descenso del NO en la EC, junto con otros mecanismos propuestos por diversos autores como son: la activación del SRA-A, mayor estimulación del sistema nervioso simpático a catecolaminas, vasoregulación, efectos mineralocorticoides del cortisol, inhibición en la producción de otros agentes vasodilatadores como prostaciclina, prostaglandina E2 y calicreína, aumento en los niveles plasmáticos de VEGF (importante factor angiogénico), mayor sensibilidad a las catecolaminas, insulinoresistencia (Magiakou et al., 2006; P. Smets et al., 2010), remodelación vascular y disfunción endotelial entre otros, mencionados en el apartado SC e Hipertensión (Chandran et al., 2011; Isidori, Graziadio, et al., 2015; Iuchi et al., 2003), sería una de las causas de la HTA, evidenciándose por la importante correlación observada entre el NO y ambas presiones arteriales.

Varios autores refirieron que serían hipertensos entre el 20 al 86% de los perros con EC (Lien et al., 2010; R Novellas et al., 2008; Hurley & Vaden, 1998; Ortega et al., 1996), según el autor y según consideren uno o ambos tipos de presiones y el método de medición. En la experiencia 1 donde se han evaluado ambas presiones arteriales, el 80% de los perros fueron hipertensos siendo determinante el incremento de la PD. Es de remarcar el hecho que ésta presión fue la única que estuvo elevada en el 20% de nuestros animales estudiados, estando normal la PS. No se halló la situación contraria, elevada la PS con la PD normal. De haberse considerado únicamente la PS, sólo el 60% de los perros serían hipertensos, por lo que es muy probable que su incremento sea más tardíamente conforme la enfermedad siga su curso y se vean más afectados los mecanismos vasodilatadores y se incorporen los otros mecanismos mencionados para desarrollar hipertensión (Magiakou et al., 2006; Novellas et al., 2008; Wehner, Hartmann, & Hirschberger, 2008) y por eso, además de la metodología de evaluación utilizada y ser la PS la única en ser medida, el grupo de Lien et al., (2010) apenas reporta el 20% como hipertensos.

Si bien ambas presiones correlacionaron con el NO, al analizar su correlación con el cortisol vemos que el impacto de la hormona es mayor sobre la PD que sobre la PS. Por lo tanto es de suponer que la primera se vería afectada antes y en mayor medida que la sistólica por acción combinada del exceso de cortisol y del descenso del NO, pudiéndose considerar que el perro con EC es eminentemente hipertenso diastólico (P. N. Vidal et al., 2018). Para respaldar lo dicho, en un trabajo se encontró que la respuesta de la PD y presión media a la noradrenalina es mayor en perros con EC, no viendo lo mismo en la PS (Heaney et al., 1999).

La hipertensión diastólica se asoció con la presencia de proteinuria evaluada por medio del UPC (indicador de daño glomerular), correlacionando con ella y siendo un factor de riesgo. También se correlacionó y asoció con la disminución del GFT. No se ha hallado en el perro con EC otros reportes semejantes al respecto. Wehner et al., (2008) encuentran correlación entre la UPC y la PS en perros afectados por diversas enfermedades que provocan hipertensión arterial sin hacer discriminación por enfermedad (sólo 2 casos con patología endócrina: Diabetes Mellitus y EC), además de evaluar sólo la PS.

En los trabajos de Ortega et al., 1996 y Schellenberg et al., 2008 se halló correlación entre la presión arterial y la severidad de la proteinuria en perros con SC espontáneo. En nuestro estudio se han analizado sólo los perros con EC, por lo que no se puede hacer extensivo el hallazgo a los casos con tumor adrenal o con otras endocrinopatías. Debido a lo expuesto es importante considerar la PD, ya que de no controlarse rápidamente su aumento empezaría a dañar el glomérulo, a través de estimular un hiperfiltrado que altera la permeabilidad capilar del glomérulo, permitiendo el filtrado de proteína de alto peso molecular y afectándose la GFT (Cianciolo, Hokamp, & Nabity, 2016; Lees et al., 2005; Wehner et al., 2008) pudiendo llegar al daño renal.

Por lo expuesto y dado la correlación existente entre ambas presiones arteriales con el cortisol y el NO, y de la PD con la UPC y el GFT es esperable que el perro recientemente diagnosticado con EC ya sea hipertenso y presente algún grado de daño glomerular; coincidiendo con varios autores (Lien et al., 2010; Martiarena et al., 2007; P. M. Y. Smets, Lefebvre, Kooistra, et al., 2012).

La sospecha de que haya daño renal ya establecido se refuerza por los hallazgos en el IR de la arteria renal. Este índice se encontró alterado en el 40-50% de los casos (según el riñón evaluado) y correlacionó con el cortisol y el NO, pero no con las presiones arteriales. Tanto en humanos como en perros con SC se ha visto que el exceso de cortisol incrementa la resistencia vascular renal (Chetboul et al., 2012; Novellas et al., 2008; Petersen et al., 1997), además tanto el cortisol como el NO afectarían a la arteria renal por los mecanismos ya previamente discutidos.

A diferencia de lo comunicado en medicina humana respecto que el IR correlaciona con la PS y no con la PD (Ingaramo, 2003), nuestros resultados coinciden con respecto a la PD pero no lo referente a la sistólica, siendo motivo de futuro estudio. El 50% de los perros con hipertensión diastólica y sistólica tuvieron el IR elevado, por lo que es de suponer que en estos casos ya haya daño del parénquima renal y de la vasculatura intraparenquimatosa (Morrow et al., 1996; Novellas et al., 2008; Petersen et al., 1997).

Es probable que el parénquima renal se vaya afectando progresivamente según el tiempo de evolución de la EC y del estado hipertensivo no tratado; si bien el IR suele indicar presencia de alguna alteración del parénquima renal/vascular, no es específico ni tan sensible (Don et al., 1989), ya que en una obstrucción uretral se ve afectado y hay reportes de alteraciones limitadas al glomérulo donde aparece normal (Platt, Ellis, Rubin, DiPietro, & Sedman, 1990), por lo tanto, con un valor de $IR < 0.7$ no se debe descartar el daño renal siendo indicativo que el riñón aún puede recuperarse. Por el contrario, un valor de $IR > 0.7$, asociado a hipertensión y $UPC > 0.5$ darían un pronóstico reservado (Wehner et al., 2008).

Esta evolución lenta pero progresiva hacia el daño renal explicaría la asociación entre el IR y la UPC pero que no estén correlacionadas.

Previo a la detección de proteína de mayor peso molecular (lo que analiza el estudio UPC) ya se puede detectar microalbuminuria debido al incipiente daño de glomérulo (De Jong & Gansevoort, 2009; Lien et al., 2010). Este microfiltrado proteico va afectando lentamente al parénquima renal (Martíarena et al., 2007; Shibata & Fujita, 2012), sin embargo no sería aún lo suficiente como para verse reflejado en los estudios por ecografía con Doppler (siendo el $IR < 0.7$) ni por el radio-renograma excretor (siendo el $GFT > 3\text{ml/kg/min}$). Por razones metodológicas no se ha podido evaluar la microalbuminuria en este trabajo, por lo que es probable que la cantidad de individuos afectados sea aún mayor. Según el estudio de Lien et al., (2010) la microalbuminuria está presente en el 52.5% de los perros con EC, por lo que habría que considerar que al momento de evaluar el IR y la UPC ya haya daño glomerular y del parénquima renal en el perro con EC. La microalbuminuria es utilizada como un screening para detectar estadios tempranos de enfermedad renal y cardiovascular en humanos (Bigazzi, Bianchi, Baldari, & Campese, 1998; Janssen, Twickler, Jublanc, Cramer, & Bruckert, 2008); y se la asocia con enfermedades sistémicas subclínicas y renales en perros y gatos (Lien et al., 2010).

En el presente estudio el 65% de los casos tuvo un valor de $UPC > 0.3$ considerando en conjunto los que presentaron UPC inespecífica (10%) y aquellos con valores > 0.5 (55%), siendo la proteína predominante albúmina de origen glomerular acorde al proteinograma electroforético urinario (Martíarena et al., 2007) y siendo además los perros hipertensos. Estos datos contrastan con los del grupo de Y. Lien et al., 2010 para quienes sólo el 32.5% de los perros tienen albuminuria, indicando un estado más avanzado de daño glomerular. Esta discrepancia puede ser, por un lado, porque los animales de ambos estudios tengan diferentes tiempos de evolución de la EC (más tiempo en nuestro caso) y, por otro lado si consideramos lo referido a la microalbuminuria se ve que es semejante a los datos de este trabajo, por lo que la

UPC y el proteinograma electroforético con SDS-PAGE estaría incorporando la microalbuminuria en el caso del perro.

Resumiendo, en caso de hipertensión diastólica y UPC en valores ya mayores de 0.3 es altamente probable que el glomérulo esté comprometido y se avance hacia el daño parenquimatoso. En estos casos el valor del IR será de utilidad como indicador del estado del parénquima renal.

Respecto al radio-renograma excretor ningún perro presentó un deterioro funcional severo, si bien en el 25% un riñón estuvo más afectado que el otro. Como se mencionó previamente el GFT se ve afectado por las concentraciones del NO en forma inversa. Posiblemente sea el reflejo de la menor vasodilatación de las arteriolas eferente y aferente, provocando disminución del flujo plasmático renal (Denton, Li, Anderson, & Whitworth, 2001).

Si bien los glucocorticoides administrados en corto tiempo incrementan el GFT (Wen, Li, & Whitworth, 2000) la exposición crónica como en el caso del SC provocan el efecto opuesto (Haentjens et al., 2005; P. M. Y. Smets, Lefebvre, Kooistra, et al., 2012; P. Smets et al., 2010) ya que existe un efecto contraproducente y a largo plazo el efecto del cortisol sobre la GFT persiste incluso en individuos con remisión del SC. Considerando que la mayoría de los perros estudiados (65%) presentó el GFT normal, pese a ya tener afectado el IR y presencia de proteinuria, indicaría que la filtración no se ve afectada tempranamente y que la poliuria propia de la EC no sería por una mayor filtración, sino principalmente por verse afectada la hormona ADH, ya que los corticoides producen resistencia de la misma a nivel renal y además alteran la osmorregulación a nivel central para su liberación (Baas et al., 1984; Knoepfelmacher et al., 1997). Tanto el GFT como el RT no correlacionaron con el cortisol (al menos en forma directa) y esto puede explicarse por lo que postulan Haentjens et al., 2005. El presente estudio evaluó en un momento puntual y no prospectivamente tanto al cortisol como el GFT y RT, lo que explicaría esta falta de correlación.

Referente a los otros indicadores de función renal analizados (densidad urinaria, urea y creatinina), Feldman & Nelson, 2004 describen que en perros con SC el 85% presentan densidades <1020. Nuestros datos se aproximan a éste valor (60% de los casos). Que la densidad urinaria no sea netamente hipostenúrica (<1010) pese a la poliuria-polidipsia presente, se puede atribuir a la presencia importante de proteinuria, como también, al hecho de que estos perros tienen capacidad de concentrar orina.

Es necesario remarcar que las concentraciones de urea y creatinina se hallaron dentro del rango de referencia para el laboratorio, coincidiendo con lo publicado por Feldman & Nelson, 2004 en perros con EC. Estos autores postulan que puede tratarse de estados subclínicos de enfermedad renal, dado que las concentraciones de urea y creatinina aumentan cuando la enfermedad se encuentra avanzada. Lo observado en el estudio por radio-renograma excretor explicaría las concentraciones normales de urea y creatinina, y apoyan lo propuesto por Feldman y Nelson, 2004.

9.2. Discusión resultados de Experiencia 2:

En esta experiencia se quiso evaluar por un lado cual terapia renoprotectora era más efectiva, y por otro cual tenía mayor eficacia hipotensora en perros con EC.

Las terapias farmacológicas comparadas tenían mecanismos de acción diferentes. Por un lado se utilizó Enalapril, un inhibidor de la ECA. Este es un fármaco muy conocido y utilizado en medicina humana y en animales domésticos, en especial perros (S. A. Brown et al., 2003; Cortadellas & Fernández-del Palacio, 2012) para la reducción de la hipertensión arterial sistémica, como también por tener efectos renoprotectores, reduciendo la excreción urinaria de proteína y retardando de esta forma el progreso hacia la enfermedad renal (Grauer et al., 2000).

El otro fármaco administrado fue Doxazosina mesilato, antagonista de receptores α_1 - adrenérgicos, utilizado más comúnmente en medicina humana como antihipertensivo de tercera línea, cualquiera sea la causa de la misma, ya sea en enfermedad renal crónica (Roble et al., 2005; Tagle, 2010), feocromocitoma (Oleaga & Goñi, 2008; Sánchez Trucios, 2010), hipertensión resistente (Pio-Abreu & Drager, 2018). También es usado en otras patologías por su mecanismo de acción, como por ejemplo en la hiperplasia protática benigna y obstrucciones uretrales (Chang et al., 2015; Gonçalves Pupe et al., 2013). Se vio que tiene cierta acción aumentando la apoptosis y reduciendo el crecimiento prostático (Remaley, 2007) y otros usos están en investigación.

Es ampliamente conocido el efecto renoprotector del Enalapril, reduciendo la excreción de proteína urinaria y controlando la hipertensión, mecanismo logrado por la dilatación de la arteriola eferente (S. A. Brown et al., 2003). De esta forma se opondría a la acción de la Ang II, que si bien provoca vasoconstricción de la arteriola aferente como la eferente, hay estudios que indican que actuaría particularmente en la eferente (Carmines, Perry, Hazelrig, & Navar, 1987; Hall et al., 1977).

Teniendo en cuenta todos los efectos de la Ang II sobre el glomérulo, es de suponerse el efecto renoprotector directo del Enalapril. A pesar de lo expuesto, y del aval de muchos trabajos de los diversos autores mencionados, en nuestro grupo de trabajo si bien se obtuvo reducción de la proteinuria con el tratamiento del Enalapril respecto al inicio del tratamiento y comparándolo lógicamente con el grupo de animales con UPC negativo (grupo D), no hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con Enalapril (grupo A) versus Doxazosina (grupo B), ni entre el grupo de Enalapril y el grupo E (control: UPC positivo y normotensos). Sólo se vio una diferencia significativa entre el grupo B y el grupo E.

El grupo E corresponde a animales con proteinuria pero sin hipertensión, el objetivo de este grupo es tratar que aquellas variaciones en la proteinuria debidas a la EC y al tratamiento específico de la enfermedad sean contempladas. En este trabajo el análisis siempre fue utilizando el “delta” o variación (concentración final – inicial).

Estos resultados pueden deberse a que no fue suficiente el número de pacientes en ambos grupos, sobretodo en el grupo A: Enalapril por no dar diferencias significativas respecto al grupo E, o que tampoco fue suficiente el tiempo de tratamiento, solo tomamos una muestra basal al inicio y otra a los 3 meses, ya que hay evidencia no solo en trabajos sino en nuestros pacientes, en el Delta UPC que muestran que si tiene efecto, solo que la que mas efecto tendría es la Doxazosina.

En un trabajo donde se utilizó el Enalapril, mencionan que dentro del mes del tratamiento debería comenzar a verse la reducción en la proteinuria (S. A. Brown et al., 2003), los resultados de dicho trabajo resultan demasiado rápidos, no fue nuestro caso con ninguno de los 2 fármacos probados, no se encontró trabajos similares como ese último sobre la Doxazosina tampoco. Hay que tener en cuenta, que el mecanismo del Enalapril, es actuar únicamente a través de la inhibición de la ECA, impidiendo formación de Ang II, pero existe formación de Ang II por otras enzimas no-ECA (D. A. Duprez, 2006; Magiakou et al., 2006), que no estarían siendo bloqueadas con el Enalapril, pudiendo haber formación local y sistémica por estas otras enzimas y actuando sobre los receptores AT1, que son los involucrados y conocidos, hasta el momento, con los efectos nocivos, al mismo tiempo existe formación de otro péptidos derivados de Ang I y Ang II que si bien no se saben sus efectos aun, están en estudio, podrían verse involucrados (D. A. Duprez, 2006; Watanabe et al., 2005). También, los diversos mecanismos que constituyen a la hipertensión en el SC, no estarían siendo bloqueados por este fármaco, por lo que podría estar impedido su efecto renoprotector indirectamente por no poder regular tanto a la presión arterial, como se ve en pacientes que padecen únicamente enfermedad renal y/o hipertensión arterial y dar resultados como los nuestros.

Existen dentro de las posibilidades en la clínica veterinaria, que como el tratamiento está sujeto al cumplimiento y compromiso del propietario, ya que no es suministrado en consultorio (por tratarse de fármacos de uso diario y vía oral, en pacientes que no requieren internación), por lo tanto debemos confiar en que fue cumplimentado como fue indicado de forma estricta, esto puede impactar en los resultados de cualquier parámetro en relación a cualquier fármaco.

Respecto a la Doxazosina, es un eficaz antihipertensivo, con diversos usos, muchos de los cuales están en investigación. Hay trabajos que demuestran ciertos efectos renoprotectores, habiendo reducción de la excreción urinaria de proteína (Jyothirmayi, Alluru, & Reddi, 1996; Mori, Matsubara, Nose, & Shibasaki, 2001). En medicina humana es utilizado en pacientes con enfermedad renal de forma segura, con objeto de reducir la presión y evitar un mayor deterioro producto de la hipertensión (Roble et al., 2005).

Podemos encontrar receptores α_1 -adrenérgicos en las células del músculo liso, por ejemplo, el vascular (Michel & Rump, 1996). El sistema nervioso simpático juega un rol importante en la regulación cardiovascular, presión arterial sistémica y resistencia vascular a través de la activación de sus receptores α -adrenérgicos (α_1 y α_2) (Chapman et al., 2010). También desempeñan un papel importante a nivel renal en el desarrollo de la hipertensión.

El riñón es un órgano altamente vascularizado e inervado, por tal motivo la estimulación adrenérgica es tan relevante en el desarrollo de la hipertensión (de Leeuw, Van Es, de Bos, & Birkenhager, 1986). La estimulación de estos receptores incluye vasoconstricción general e intrarenal, aumento de la renina, reabsorción de sodio, potasio, bicarbonato y agua en túbulos proximales y colectores, como también la inhibición de la vasopresina y la parathormona (Michel & Rump, 1996). Este efecto de retención de iones y agua, tiene cierta controversia, ya que hay reportes mencionando como un efecto adverso del uso de fármacos bloqueantes α_1 -adrenérgicos, como la doxazosina, a la expansión de volúmenes de líquidos corporales (Roble et al., 2005), pudiendo asociarse esto con una evolución a la falla cardíaca en paciente con dicha enfermedad presente pero de forma subclínica (Bryson & Psaty, 2002). Sin embargo, muchos autores hablan de su utilización de forma segura, valiéndose de su mecanismo de acción para ejercer su efecto antihipertensivo (Holdaas et al., 1995; Jekell, Kalani, & Kahan, 2017; Kanazawa et al., 2004; Mori et al., 2001), donde al bloquear de forma selectiva el receptor α_1 -adrenérgico, como lo hace la doxazosina, se impide la unión de la noradrenalina a las células del músculo liso, permitiendo su relajación, y así reduciendo el tono vascular y la resistencia periférica (Chapman et al., 2010; Remaley, 2007).

En nuestros resultados se ha obtenido mayor efecto reductor de proteína urinaria con la Doxazosina, comparando grupo B con grupo E, esto podría ser explicado por acción indirecta a través de la reducción de presión arterial, por lo mencionado en el párrafo anterior, y ya que hay trabajos que demuestran que genera vasodilatación pre glomerular de las arteriolas, a través de la inhibición de la vasoconstricción dada por la noradrenalina (Mori et al., 2001), mejorando la filtración glomerular y reduciendo proteinuria, de forma muy similar a un fármaco IECA.

Mori et al., 2001 demuestran una correlación entre la disminución de la presión arterial y la reducción de la proteinuria en su estudio.

También están descritos otros efectos beneficiosos de la doxazosina, que colaboran en la protección del riñón de forma indirecta y retardan el avance hacia la enfermedad renal. Estos efectos fueron descritos por primera vez en los años 80', donde se descubrieron efectos reductores en lípidos al utilizar este fármaco (Remaley, 2007). Teniendo en cuenta que las dislipemias son un factor de riesgo hacia la progresión de enfermedad renal (Kimura et al., 2017). Se vio que en animales de experimentación que recibían una dieta rica en colesterol desarrollaban más rápido lesión glomerular, mientras que los que recibían terapia antihiperlipidémica tardaban más en desarrollarla.

La hiperlipidemia y la hipertensión juntas inducen más daño glomerular, que por separado (Mori et al., 2001). Se vio entonces que los pacientes que recibían doxazosina tenían una disminución en los triglicéridos y colesterol. Se reportó disminución del colesterol total, de lipoproteínas de baja densidad (LDL), prevención de la oxidación del LDL, disminución de apolipoproteína b y Apo A1, pequeña elevación de lipoproteínas de alta densidad (HDL), y también mejoras en la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la terapia con insulina (Chapman et al., 2010; Remaley, 2007). La utilización crónica de Doxazosina altera la expresión de varios genes (Remaley, 2007).

Teniendo en cuenta estos efectos beneficiosos extras, además de la reducción de la presión, podría ser que en nuestros resultados, esta mayor eficacia renoprotectora de la Doxazosina, se pueda deber a la suma de estos efectos, teniendo en cuenta que en los animales con EC, presentan alteración en los triglicéridos y colesterol, y tendencia a la insulinoresistencia e intolerancia a la glucosa.

En cuanto a los efectos hipotensores, los resultados de la experiencia han dado que ambos fármacos sirven de igual modo en reducir la PD sobretodo, comparándolos entre sí (A vs B) y entre el grupo control D y E, es decir, si bien entre ellos hubo diferencias significativas, en las comparaciones individuales, demuestran que sirven por igual reduciendo la presión, aunque habría más efecto con la Doxazosina, condiciendo con otros autores (Holdaas et al., 1995; Jekell et al., 2017).

En cuanto a la PS, no hubo diferencias significativas entre A y B, y comparando individualmente, sólo se vio diferencias significativas entre grupo B tanto con D y E.

Esto significa, que ambos fármacos cumplen un rol importante en la reducción de la presión arterial, cada uno basándose en su mecanismo de acción específico, pero tendría una acción superadora la Doxazosina, por actuar tanto a nivel de la PS como PD, a través del bloqueo de la vasoconstricción que ejerce el sistema nervioso simpático mediante la unión de la noradrenalina a su receptor específico α_1 -adrenérgico, permitiendo así la vasorelajación.

También se vio una mayor eficacia en la reducción de la PD de la Doxazosina comparándola con el grupo control D. Esto podría deberse también a los efectos sistémicos α_1 -bloqueantes específicos, pero por permitir, además, una mayor tasa de filtración renal, por favorecer la dilatación vascular preglomerular (Holdaas et al., 1995), entonces colabora en la reducción de la presión a través de efectos hemodinámicos intrarenales.

Como coincide que la Doxazosina tuvo un efecto levemente superior a nivel renoprotector como hipotensor, se podría suponer que se debe la suma total de los efectos beneficiosos expuestos.

El Enalapril, es uno de los fármacos de primera elección a la hora de reducir la presión arterial, como también es elegido junto a otros fármacos de la familia, por el efecto renoprotector, pero como fue expuesto anteriormente, sus resultados tan efectivos suelen darse en pacientes que no tienen la interacción de diversos mecanismos que contribuyen a la hipertensión, como ocurre con los que padecen SC, en ellos son tan amplios los mecanismos involucrados para el desarrollo de la hipertensión y sus repercusiones y comorbilidades asociadas, que es posible que como se propuso anteriormente, la acción sola inhibiendo a la ECA, no sea suficiente para este tipo de pacientes con esta enfermedad en particular.

No lo hemos probado, pero se utiliza mucho en medicina humana la combinación de dos terapias para el manejo de la hipertensión y renoprotección, ya que ambos problemas están íntimamente relacionados. Sería una muy buena opción la combinación de un fármaco IECA con un antagonista α_1 -adrenérgico, por la suma de sus efectos antihipertensivos específicos como también los efectos beneficiosos

secundarios (Jekell et al., 2017; Kanazawa et al., 2004), mencionados en los párrafos anteriores. Esta combinación es utilizada en humanos con diversas patologías de base donde el manejo hipertensivo a monodroga no es efectivo o son resistentes a la misma, pero no ha sido probada en perros. Sería muy útil ya que la suma de los efectos extra antihipertensivos de ambos fármacos, tiene gran implicancia en la EC, por las alteraciones metabólicas y comorbilidades que esta genera. Esta combinación serviría para otro estudio.

9.3. Discusión resultados de Experiencia 3:

En lo que respecta a otra de las comorbilidades asociadas a la EC, se encuentra la hipercoagulabilidad con riesgo de desarrollo de trombosis.

El desbalance a favor de la hipercoagulabilidad reportado por varios autores está formado por el aumento de varios factores de coagulación como el factor II, V, VII, VIII, IX, X, XII, FvW, PAI-1, y disminución de la ATIII (Fatti et al., 2000; Manetti et al., 2010; Trementino et al., 2010; P. Vidal et al., 2016). Datos reportados en humanos y en perros (Kastelan et al., 2009; Teshima et al., 2008). Esto respalda nuestros resultados, ya que también hemos encontrado significativamente aumentadas las concentraciones plasmáticas de PAI-1 y FvW en los pacientes con EC respecto a los controles sanos, como también se vio disminuida la actividad de ATIII (experiencia 3).

El FvW media la adhesión de las plaquetas al subendotelio vascular (Giblin et al., 2008), esta es una razón por la cual un autor expone que no podría ser medido el aumento agudo del FvW en caso de injuria vascular, por quedar atrapado en el subendotelio (Brott et al., 2014). Está demostrado que el exceso de glucocorticoides estimula la producción y liberación de FvW y también del factor VIII, quien estabiliza la unión con la plaqueta (Trementino et al., 2010). En algunos estudios se demuestra que hay un alto contenido de FvW dentro de las plaquetas de humanos y ratas, por lo que al haber lesión vascular aguda, por ejemplo una venopunción, se genera una mayor liberación de este factor aumentando su concentración plasmática, eso no se corresponde en el perros, ya que el contenido de FvW en sus plaquetas no es tan elevado y ante injuria no se evidenciaría tal aumento (Brott et al., 2014).

Estudios en humanos han demostrado que en algunos pacientes con SC se encuentra aumentada la concentración de FvW y en otros pacientes con SC no, esto se debe a que se ha demostrado que algunos individuos tienen un polimorfismo particular en el promotor del gen del FvW que desempeña un rol importante en el riesgo de desarrollar trombosis (Daidone et al., 2011; Trementino et al., 2010). Es decir, que aquellos que tienen el haplotipo 1 y sobre todo con homocigosis en el genotipo 1/1, tienen mayor

predisposición, que aquellos que no lo tienen, por ser más sensibles a los efectos del cortisol, por su acción génica en estos genes (Daidone et al., 2011).

Esto no fue analizado en perros aun, pero sería muy interesante saber si existe alguna predisposición similar al humano, ya que en nuestros resultados, si bien la mayoría de nuestros perros con EC arrojó concentraciones elevadas, no todos lo tenían así, esta podría ser una explicación a nuestros resultados; como también mencionar que esos trabajos hablaban sobre situaciones agudas mientras que la EC es un estado de hipercortisolismo crónico, y todas sus alteraciones y complicaciones (comorbilidades asociadas) se deben sobre todo a la cronicidad del efecto del cortisol.

Algunos autores proponen al FvW como marcador bioquímico de activación o disfunción endotelial, siempre y cuando se haga diferenciación del cuadros patológicos, ya que el FvW puede aumentar y generar agregación plaquetaria en presencia de endotoxinas tanto en humanos como en perros (Brott et al., 2014), dicha esta salvedad, coincidimos en la utilidad del FvW como marcador de riesgo de trombosis asociado al cuadro clínico de disfunción endotelial, hipertensión, disminución del NO y alteraciones metabólicas provocadas por los corticoides (Iuchi et al., 2003). Nuestros resultados demostraron correlación inversa entre FvW y NO, reducido por acción de los corticoides impidiendo la correcta vasodilatación, lo cual también colabora a la disfunción endotelial, hipertensión y agregación plaquetaria.

El FvW correlaciona con el cortisol, demostrado por varios autores (Kastelan et al., 2009; Trementino et al., 2010) lo cual es compatible con nuestros resultados a nivel clínico, ya que no hemos hecho esa correlación. Se vio además, que dentro de nuestros pacientes de la experiencia 3, 7/12 perros con EC presentaron hipertensión arterial, coincidiendo con los valores más elevados de FvW y PAI-1, esto se explica por la relación inversa entre FvW y NO, correlación inversa entre Cortisol y NO, la relación entre cortisol e hipertensión, efecto de los glucocorticoides y disfunción endotelial que también se relaciona, con descenso de NO e hipertensión (Fatti et al., 2000; Heaney et al., 1999; Isidori, Graziadio, et al., 2015; Iuchi et al., 2003; Prázný et al., 2008).

Muchos autores demostraron que las concentraciones de PAI-1 están elevadas y la actividad fibrinolítica se encuentra disminuida en los pacientes con EC (Erem et al., 2009; Fatti et al., 2000; Klose et al., 2011; Van der Pas et al., 2012). Esto coincide con nuestros resultados, ya que también en nuestros pacientes con EC la concentración fue significativamente elevada comparada con el grupo control. Correlacionó inversamente con el NO. Y al igual que el FvW, se vio en algunos reportes mencionan que el PAI-1 correlacionó de forma positiva con el cortisol (Erem et al., 2009) lo que potencia el riesgo de desarrollar trombosis en condiciones de hipercortisolismo crónico.

Está demostrado que el PAI-1 puede ser sintetizado por los adipocitos (Alessi, Peiretti, Henry, Nalbone, & Juhan-Vague, 1997) y que también se encuentra aumentado en el síndrome metabólico, condición que engloba obesidad central o visceral, insulinoresistencia, hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa, hipertensión, hipertrigliceridemia/dislipemias y asociación a riesgo de desarrollar enfermedad cardíaca, y que está presente en los pacientes con SC (Alessi et al., 1997; Dellas & Loskutoff, 2005). La expresión del gen del PAI-1, es a su vez, inducido por muchos componentes del síndrome metabólico. En la obesidad el tejido adiposo aumenta la producción de PAI-1. Hay una intensa correlación positiva entre aumento de grasa visceral/peso corporal y concentración del PAI-1 (Juhan-Vague, Alessi, Mavri, & Morange, 2003).

El hiperinsulinismo y la insulinoresistencia inducen aumento del PAI-1 en humanos, ratones y conejos desde los adipocitos (Carmassi et al., 1999; Samad & Loskutoff, 1996; Samad, Pandey, Bell, & Loskutoff, 2000). La hipertrigliceridemia también se asocia al aumento del PAI-1 (Birgitta Sundell, Nilsson, Hallmans, Hellsten, & Dahlén, 1989).

El síndrome metabólico está asociado a la hipertensión. El SRA-A juega un papel importante en el control de la presión arterial, y la Ang II es una hormona que estimula síntesis de PAI-1. Se vio que los IECA reducen PAI-1. Hay una gran relación entre hipertensión y PAI-1 (N. J. Brown, Agirbasli, & Vaughan, 1999; Skurk, Lee, & Hauner, 2001). Esto último también coincide con nuestros resultados, ya que de los 12 pacientes con EC, 7 eran hipertensos y coincidían con los valores elevados del PAI-1. El PAI-1 también se asocia con diabetes (Kastelan et al., 2009).

Con lo expuesto podemos decir que como el cuadro del síndrome metabólico es compartido por los pacientes con EC, podemos suponer que los riesgos de trombosis asociados al aumento del PAI-1 con disminución en la fibrinólisis, se deben a la acción de los glucocorticoides como también al síndrome metabólico que padecen por la EC, que a su vez estimulan la producción de PAI-1.

Para terminar de colaborar con el desbalance en los mecanismos de coagulación, se postula por muchos autores la disminución plasmática de ATIII (B. F. Feldman, Rasedee, & Feldman, 1986; Jacoby et al., 2001; Teshima et al., 2008; Van der Pas et al., 2012) en humanos y en perros. Su deficiencia causa desbalances favoreciendo los estados protromboticos con riesgo de trombosis.

Coincidiendo con lo expuesto por los trabajos de Jacoby 2001, Feldman 1986, Teshima 2008, entre otros, nuestros resultados también muestran una reducción en la actividad plasmática de ATIII en los perros con EC. Este resultado se asocia con aquellos perros con EC que presentaban UPC+ y DD+ (resultados de experiencia 3).

La asociación inversa entre disminución de ATIII y aumento de proteinuria, está respaldado por otros autores que postulan lo mismo (Singhal & Brimble, 2006). El fundamento de esto, es que la ATIII es una proteína del mismo peso molecular, tamaño y carga que la albumina, por lo tanto, puede ser filtrada por el glomérulo al igual que la albumina (de Laforcade, 2012; Kauffmann, De Graeff, Brutel del la Rivière, & Van Es, 1976), encontrándose presencia de ATIII en orina (Vaziri et al., 1984).

Se postula a las enfermedades glomerulares y nefropatías perdedoras de proteínas en perros, como causa de la disminución de ATIII (de Laforcade, 2012). Nosotros no hemos medido ATIII en orina, solo la actividad en sangre, la cual evidenció estar disminuida. Entonces podemos suponer por lo expuesto, que esta sería una explicación de su disminución en los niveles plasmáticos. Esto está sustentado por la evidencia del riesgo de trombosis en casos de síndrome nefrótico, caracterizado por edema, hipoalbuminemia, proteinuria, hiperlipidemia, hipercoagulabilidad (Singhal & Brimble, 2006).

En este cuadro, generado por diversas causas/patologías que lleven hacia el daño glomerular, se evidencia disminución de ATIII plasmática, la cual es filtrada a través del glomérulo junto con albumina, favoreciendo el cuadro de hipercoagulabilidad, además de proteinuria. Singhal and Brimble, 2006 postula correlación inversa entre ATIII plasmática y proteinuria, similar a nuestros resultados. Algunos trabajos (Kauffmann et al., 1978; Rosenberg et al., 1998), inclusive el de Singhal 2006, comentan sobre la asociación entre disminución plasmática de ATIII y disminución de albumina plasmática, en nuestros pacientes no hubo cambios en la concentración de proteínas totales ni albumina en sangre, probablemente porque no han llegado a un daño glomerular tan significativo como para desarrollar enfermedad renal todavía o síndrome nefrótico con todas las manifestaciones clínicas, ni tampoco presentan lesión hepática con lo que haya menor síntesis.

También se ha postulado por muchos autores, el aumento del complejo trombina-antitrombina (TAT) y disminución de ATIII (de Laforcade, 2012; Klose et al., 2011; Manetti et al., 2010) tanto en perros como en humanos con SC (Fatti et al., 2000) o por otra patología que tenga alto riesgo de trombosis, tomándose este complejo TAT como marcador de riesgo de trombosis. Nosotros no hemos medido el completo TAT, pero esta sería otra forma de explicar porque los niveles plasmáticos de ATIII están disminuidos, sería una disminución por “consumo” para formar dicho complejo.

Otro elemento compartido por el síndrome nefrótico como por los pacientes con EC, SC y síndrome metabólico, son los efectos de la hiperlipidemia o dislipemias que colaboran al daño glomerular y la agregación plaquetaria (Kasiske et al., 1988). Los pacientes con EC en nuestro estudio, no han desarrollado síndrome nefrótico al momento del estudio, pero muchos eventos y cambios metabólicos son similares, por lo cual el mecanismo sería compartido.

Dentro los resultados obtenidos en ésta experiencia, hemos nombrado al DD el cual correlacionaba positivamente con la proteinuria y negativamente con la actividad de ATIII.

El DD se ha medido en el laboratorio de nuestro hospital a través de la aglutinación en látex, método validado y considerado con mayor especificidad y sensibilidad que por ELISA (Dewhurst, Cue, Crawford, & Papasouliotis, 2008; Monreal, 2003). El inconveniente de este marcador, es en general la falta de especificidad (Nelson, 2005; Nelson & Andreasen, 2003), ya que el DD da positivo en diversas patologías como neoplasias, sepsis, inflamaciones, infecciones, cirugía, traumas, isquemias (Fukuoka, Takeuchi, Matsumoto, Bando, & Suda, 2014).

Por otro lado, no es confiable usarlo como único marcador de riesgo de trombosis porque su positividad puede responder a un proceso de trombosis que ya ocurrió y se resolvió, o tratarse de: ya sea un cuadro crónico, uno activo o deberse a alguna de las otras causa mencionadas; si da negativo, no puede descartarse el riesgo de trombosis, ya que por ejemplo en un proceso agudo como una CID (coagulación intravascular diseminada), podría dar resultado negativo debido a un consumo excesivo. Hay reportes de perros con EC y trombosis activa y el DD dar negativo (Epstein et al., 2013).

Lo que se puede inferir respecto a este marcador, es que puede ser de utilidad como un screening rápido pero siempre asociado a otros marcadores de riesgo de trombosis bioquímicos como el FvW, el PAI-1, la actividad de ATIII, el TAT entre otros y siempre debe asociarse a los signos clínicos en relación a la enfermedad (Epstein et al., 2013; Monreal, 2003). Los resultados obtenidos respecto a este marcador evidencian la correlación que hay entre los otros indicadores, UPC y ATIII, utilizados en EC para demostrar las alteraciones que se producen en el metabolismo de los pacientes con dicha enfermedad y los riesgos con la trombosis, y su interrelación con las demás variables involucradas en la formación de trombos como ser la hipertensión, disfunción endotelial, daño glomerular, etc.

Está demostrado que los procesos de TEP, una de las complicaciones por trombosis más frecuentes en perros con EC y con mayor tasa de mortalidad, se caracteriza por un cuadro clínico de compromiso respiratorio, suelen comenzar con taquipnea

preferentemente en reposo y con el paso del tiempo, se transforma en disnea y agitación (Burns et al., 1981; O'Dwyer, 2015; Van der Pas et al., 2012).

La prueba de referencia y de mayor confiabilidad son las de imagen vascular de los pulmones como la angiografía, tomografía computada con contraste vascular o centellografía de perfusión y/o ventilación pulmonar en humanos (Chairperson et al., 2008; Epstein et al., 2013) o angiografía, tomografía computada o centellografía de perfusión pulmonar en veterinaria (Goggs et al., 2014; Soler, Castillo, Fernando, & Velandia, 2011).

Por lo que podemos afirmar que signos clínicos de EC, cortisol elevado, hipertensión, UPC + y marcadores bioquímicos (FvW, PAI-1, ATIII, etc) demuestran con gran confiabilidad el estado protrombótico y riesgo de trombosis, pero lo único que confirma la presencia de TEP activo en perros con EC es la centellografía o método de imagen que muestra la imagen pulmonar con el área sin perfundir correspondiente al área del trombo.

En nuestros resultados el recuento plaquetario, pruebas de coagulación de rutina y F, han dado sin alteraciones. Hay discrepancia con los autores mencionados en este apartado de coagulación, donde a muchos el F y recuento plaquetario les ha dado aumentado (Erem et al., 2009). Puede ser que en nuestros resultados no se manifestaron variaciones en el F, ya sea por utilización en la formación de DD+, como en la formación de algún trombo; también puede ser que la técnica de medición sea diferente en nuestro laboratorio. Algo similar puede ocurrir con el recuento plaquetario en relación a la medición de laboratorio.

Algo importante de resaltar, con todas estas pruebas que evidencian el alto riesgo de ocurrencia de episodios trombóticos en pacientes con EC, es la necesidad de hacer terapias anticoagulantes preventivas. Está demostrado que luego de un screening de marcadores de riesgo de trombosis, es de gran utilidad la implementación de terapias profilácticas (Boscaro et al., 2002; Trementino et al., 2010; Van Der Pas, Leebeek, Hofland, De Herder, & Feelders, 2013). En humanos se hace de rutina, logrando grande mejoras en la sobrevida de dichos pacientes y reduciendo la mortalidad por esta causa. En medicina veterinaria debería comenzar a implementarse el screening y luego la terapia preventiva de ser necesario.

9.4. Discusión resultados de Experiencia 4:

Por último queda intentar explicar que rol desempeñan la Ang II y la Aldosterona, dos variables involucradas en la patogenia de la hipertensión arterial, comorbilidad tan frecuente en la EC tanto en humanos como en perros.

En los resultados de la experiencia 4 hemos encontrado coincidencia con algunos autores y discrepancia con otros, ya que en nuestros perros con EC la concentración de Ang II fue elevada respecto a los controles sanos. En algunos reportes en humanos la Ang II no presentó alteraciones (Isidori, Graziadio, et al., 2015). Respecto a la Aldosterona, no hubo variaciones entre los perros con EC y los controles sanos en nuestra experiencia. Estudios en humanos han dado mismos resultado respecto a la Aldosterona (Cicala & Mantero, 2010; Rizzoni et al., 2009).

Hay muchas discrepancias sobre la evaluación del SRA-A, sus resultados y el rol de cada uno en la hipertensión en la EC. Existen muchos más trabajos donde se han realizado mediciones de otros componentes del sistema, preferentemente de Renina y Aldosterona, donde los resultados para renina arrojan valores desde suprimidos a rangos bajos en humanos (Isidori, Graziadio, et al., 2015) y en ratones (Van der Pas et al., 2014), en perros se obtuvieron valores de renina entre bajos y sin variación comparando con controles sanos (Galac, Buijtels, Mol, & Kooistra, 2010; Javadi et al., 2003).

Algunos de estos mismos autores también midieron Aldosterona, obteniendo resultados similares a los de nuestra experiencia, hasta un poco más bajos que los controles (Galac et al., 2010; Goy-Thollot et al., 2002; Javadi et al., 2003; Van der Pas et al., 2014). Las explicaciones de estos resultados podría ser que aunque los glucocorticoides en exceso. presentes en la EC. producen una estimulación directa en el hígado aumentando la concentración de angiotensinogeno (Magiakou et al., 2006; Van der Pas et al., 2014), también estimulada su producción por el tejido adiposo visceral abundante en pacientes con hipercortisolismo (Boscaro et al., 2012), podría suceder que el *feedback* negativo hacia la renina esté alterado, y por otro lado, porque el exceso de glucocorticoides de forma prolongada podría inducir una desregulación de señalización del receptor de angiotensina.

Además por el exceso de glucocorticoides se impediría el aumento de la concentración de Aldosterona, por la saturación de la enzima 11β -HSD2, encargada de inactivar corticoides e impedir que se unan a los receptores de MR, por lo tanto estos se unirían a los receptores de MR, ejerciendo acción mineralocorticoidea, es decir, absorbiendo sodio y agua (P. Smets et al., 2010; Van der Pas et al., 2014) de esta forma como los volúmenes estarían de normales a algo aumentados, se impedirían la elevación de la concentración de renina y aldosterona, por no ser necesarias.

En el tratamiento con trilostano en perros y humanos con EC para disminuir el cortisol, se ve que previo al tratamiento renina y aldosterona están disminuidas, pero durante el mismo, al disminuir el cortisol, aumentan de forma paulatina ambas (Galac et al., 2010) sugiriendo la misma fundamentación.

A pesar de estas acciones, los niveles de sodio y potasio en pacientes con EC están dentro del rango normal, lo que significa, que la hipertensión desarrollada no sería por retención de sodio y agua como mecanismo principal (Goy-Thollot et al., 2002). Esto mismo hemos visto en los pacientes con EC que son atendidos en el hospital y han formado parte de la tesis, ninguno tuvo alteraciones en los niveles de sodio y potasio medidos dentro de los controles habituales.

Se ha reportado que los pacientes con SC tienen una mayor respuesta presora (Heaney et al., 1999), sensibilidad a la Ang II y a las catecolaminas, y mayor respuesta a los receptores β -adrenérgicos y del sistema nervioso simpático por acción del exceso de glucocorticoides. Se postula que estos inducen mayor concentración de receptores AT1 de la Ang II potenciando dichos efectos (Cicala & Mantero, 2010; Magiakou et al., 2006). Nosotros no hemos medido expresión de receptores AT1 en pacientes que murieron durante el estudio, pero estos efectos se pueden ver de forma indirecta por el aumento en la frecuencia cardíaca y taquipnea en reposo que manifiestan en los exámenes físicos desde la prime consulta y durante sus seguimientos.

En pocos trabajos se ha visto la utilización de la medición de concentración de Angiotensina para determinar estado del SRA-A en pacientes con EC. Andrea M. Isidori et al., 2015 mencionó que la Ang II no suele presentar variaciones. Por lo que hemos visto en un alto número de trabajos científicos sobre el tema, que no es de elección la medición de Ang II para evaluar el estado del SRA-A en la patogenia de la hipertensión en la EC.

Sí lo es, en cambio, la medición de renina o la actividad de renina, o la Ang I solo como forma indirecta de evaluar la actividad de renina (Galac et al., 2010; Goy-Thollot et al., 2002). Por ser mucho más representativas a la hora de evaluar la actividad del SRA-A y sensibles a las variaciones de volúmenes y electrolitos que puedan repercutir en sus funciones. Además hay reportes de producción local de Ang II, como de Aldosterona. Si bien todavía no hay evidencia al respecto sobre su influencia en la concentración de la Ang II en la circulación sistémica, podría generar alteraciones locales y no ser tenidos en cuenta y/o alterar los resultados sobre alguna otra variable como PS o PD, parámetros renales, efecto de un fármaco sobre estos, por colaborar en la hipertensión intraglomerular y alterar la tasa de filtración, proteinuria (Grauer et al., 2000).

No es lo que ocurre con la Aldosterona, que dicha producción local es despreciable en la circulación sistémica. Esta sería una explicación, respecto a nuestros resultados sobre una mayor concentración de Ang II y Aldosterona dentro de los niveles normales en nuestro grupo experimental. Pueden influir los métodos de medición en una pequeña variación de resultados.

Lo que podemos decir en base a nuestros resultados, es que el SRA parecería estar involucrado en el desarrollo de la hipertensión en la EC por los resultados que hemos obtenido de la Ang II, aunque deberíamos tener mediciones de renina como para completar esta afirmación o descartarla, y suponer que dicho aumento debe provenir de producción local de otros tejidos y formarse por enzimas no-ECA. La Aldosterona no estaría desempeñando un rol importante en la patogenia de la hipertensión en la EC, porque fue encontrada dentro del rango normal al igual que los controles sanos, concordando con el resultado de los otros autores.

La expansión de volúmenes a expensas de una mayor concentración de sodio y retención de agua, tampoco sería la causa, ya que la aldosterona nuestra y la de los trabajos junto con la renina se mantienen bajas (por la acción mineralocorticoidea de los glucocorticoides) y tampoco el agua y sodio están en exceso como para ser los causantes de la hipertensión. Los análisis de nuestros pacientes como los trabajos leídos, no muestran alteraciones en los niveles de sodio y potasio con lo cual la contribución sería mínima (Isidori, Graziadio, et al., 2015; P. Smets et al., 2010).

Hasta ahora lo que podemos inferir, sería que los mecanismos involucrados en la hipertensión, derivan de los efectos crónicos de los glucocorticoides, que tienen amplia repercusión ya sea a nivel endotelial, favoreciendo múltiples mecanismos que derivan en la disfunción endotelial, pérdida de la vasodilatación y potencian la vasoconstricción, estimulación del angiotensinogeno que llevaría a la mayor

producción de Ang II, y esta ejercería los efectos mayoritariamente de los receptores AT1, mas las acciones inflamatorias vasculares y de daño endotelial.

Por otro lado, hay reportes que indican que los pacientes hipertensos humanos tienen en circulación altas concentraciones de IL-1, IL-6, TNF- α lo que podría ser un indicativo de estados proinflamatorios vasculares (D. A. Duprez, 2006).

No hemos medido en esta tesis citoquinas proinflamatorias, pero en los trabajos de Cabrera Blatter et al., 2012, 2011 se vio que los perros con EC tienen elevada la IL-6, además de triglicéridos, colesterol, glucemia y disminuido el NO sobre todo en pacientes ciegos, y alteraciones en el endotelio vascular, lo que indicaría que si habría presente un estado proinflamatorio, sobretodo proveniente de la grasa visceral. Serían de utilidad medir algunas citoquinas mas ya que tienen relación con la obesidad visceral, el síndrome metabólico presentes en pacientes humanos y perros con EC (Horita et al., 2011; Vegiopoulos & Herzig, 2007) colaborando en el desarrollo de hipertensión.

Duprez, 2006 describió la posibilidad de liberación de PAI-1 por parte de la estimulación de receptor AT4 por Ang II. La liberación de este factor antifibrinolítico e inflamatorio por adipocitos y asociado a la obesidad (Juhan-Vague et al., 2003; Suzuki et al., 2003), influye también en la disfunción endotelial, potencia los cuadros de inflamación y por ende mecanismos que derivan en hipertensión (Prázný et al., 2008) y se relacionan con los estados procoagulables que presentan los pacientes con EC.

Todos estos mecanismos presentes e interrelacionados entre ellos y con las comorbilidades presentes en SC llevan indefectiblemente a la remodelación vascular la cual es considerada un mecanismo adaptativo cuando hay aumento de la presión sanguínea para poder normalizarla (D. A. Duprez, 2006). Esta remodelación resulta de mantener de forma crónica y sostenida los mecanismos y factores involucrados en el desarrollo de hipertensión. Se ha reportado que en pacientes con SC hay anormalidades en arterias de resistencia que presentan remodelación hipertrófica, hipertrofia o hiperplasia de las células del músculo liso vascular (Rizzoni et al., 2009), mas deposito de matriz extra celular (Schiffrin, 2004a). Esto termina disminuyendo la elasticidad de los vasos, colaborando también a la hipertensión.

Una vez instalada la remodelación vascular, es irreversible. Por tal motivo, como los más grandes mecanismos involucrados son el SRA-A, es que la primer línea de antihipertensivos recomendados son los IECA y los bloqueantes de receptores de AngII selectivos del receptor AT1 (D. A. Duprez, 2006). Hay evidencia de mejoras con el uso de estos fármacos. Colaborando también en evitar la activación y agregación plaquetaria.

Nosotros no hemos analizados los vasos de los perros con EC que han fallecido durante el estudio, pero creemos que esta remodelación vascular, por necesitar tiempo para su desarrollo, estaría presente ya que muchos de ellos demoran en llegar al diagnostico por no ser llevados a tiempo al veterinario, pudiendo estar meses hasta 1 año o 1 años y medio sin tratamiento.

CONCLUSIÓN

10. CONCLUSIÓN:

En función a todo lo desarrollado en esta tesis podemos concluir que:

Los perros con EC padecen hipertensión, con alta prevalencia y mayor predominio de aumento en la PD, generada por diversos mecanismos interrelacionados, que incluyen disminución de NO, acción de la Ang II, no así de la aldosterona.

Esto tiene implicancias en la clínica diaria de estos pacientes, ya que, la hipertensión, y los mecanismos que en ella derivan, producto del hipercortisolismo crónico de larga data hasta su diagnóstico, contribuye junto a las otras comorbilidades, en la disfunción endotelial, remodelación vascular, etc, que tienen impacto directo por un lado a nivel renal, contribuyendo al deterioro glomerular, alterando su permeabilidad a macromoléculas, favoreciendo la proteinuria y conduciendo la enfermedad renal, sino también permitiendo, por otro lado, la pérdida de ATIII, que junto a las alteraciones endoteliales y el desbalance de factores pro y anticoagulables, permiten el estado de hipercoagulabilidad que padecen, aumentando el riesgo de trombosis.

Ante lo dicho, se pueden tomar medidas para diagnóstico precoz y profilaxis:

✓ La implementación del IR a través de la ecografía doppler renal, como control y elemento pronóstico del estado renal, junto con la medición rutinaria del UPC (y microalbuminuria de contar con ella) y presión arterial. UPC y microalbuminuria son indicadores tempranos de daño renal.

✓ Para el manejo de la hipertensión arterial, la doxazosina tuvo acción superadora respecto al enalapril (si bien tuvo acción no fue tan efectiva), tanto renoprotector como hipotensor, por sus acciones directas antagonistas α_1 -adrenérgicas como por sus efector indirectos. Sería muy útil la terapia de acción de fármacos combinados con diferente mecanismo de acción para tener efecto más abarcativo, ya que la hipertensión en la EC es producida por diversos mecanismos.

✓ Finalmente en relación a la hipercoagulabilidad, es importante la utilización de indicadores de disfunción endotelial y riesgo de trombosis, como el FvW, PAI-1, actividad plasmática de ATIII o presencia de ATIII en orina, DD sólo para un screening rápido, y relacionarlo con la clínica, en especial el DD. Ante aumento de FR o jadeo en reposo, realizar confirmación con imágenes. En presencia de un marcador positivo y/o imagen, implementar terapia antiagregante plaquetaria y/o anticoagulante, ya que aumentan la supervivencia y reducen la tasa de mortalidad por TEP.

Tener en cuenta que las comorbilidades una vez instaladas son irreversibles, aunque se logre regular o normalizar el nivel de cortisol en sangre.

BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA:

- Aguilera, G., Rabadan-Diehl, C. (2000). Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul. Pept.*, 96, 23–29.
- Ahima, R., Krozowski, Z., & Harlan, R. (1991). Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J. Comp. Neurol.*, 313, 522–538.
- Ahima, R. S., & Harlan, R. E. (1990). Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 39, 579–604.
- Alabaster, V. A., & Davey, M. J. (1986). The alpha 1-adrenoceptor antagonist profile of doxazosin: preclinical pharmacology. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 21(1 S), 9S–17S.
- Alessi, M. C., Peiretti, F., Henry, M., Nalbone, G., & Juhan-Vague, I. (1997). Production of Plasminogen Activator Inhibitor 1 by Human Adipose Tissue. *Diabetes*, 46, 860–867.
- Altman, J., & Bayer, S. A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J. Comp. Neurol.*, 182, 973–993.
- Amar, A. P., & Weiss, M. H. (2003). Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am*, 13, 11–23.
- Arima, S., Kohagura, K., Xu, H.-L., Sugawara, A., Abe, T., Satoh, F., ... Ito, S. (2003). Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(9), 2255–2263.
- Ariyoshi, N., Kim, Y., Artemenko, I., Bhattacharyya, K., & Jefcoate, C. (1998). Characterization of the Rat Star Gene That Encodes the Predominant 3.5-Kilobase Pair mRNA. ACTH Stimulation of adrenal steroids in vivo precedes elevation of StAR mRNA and protein. *J. Biol. Chem.*, 273, 7610–7619.
- Asa, S., & Ezzat, S. (1998). The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocrinology Reviews*, 19, 798–827.
- Baas, J. J., Schaeffer, F., & Joles, J. A. (1984). The influence of cortisol excess on kidney function in the dog. *The Veterinary Quarterly*, 6, 17–21.
- Barahona, M. J., Sucunza, N., Resmini, E., Fernández-Real, J. M., Ricart, W., Moreno-Navarrete, J. M., ... Webb, S. M. (2009). Persistent body fat mass and inflammatory marker increases after long-term cure of Cushing's syndrome. *J Clin*

- Endocrinol Metab*, 94(4), 3365–3371.
- Barbato, J. E., & Tzeng, E. (2004). Nitric oxide and arterial disease. *Journal of Vascular Surgery*, 40(1), 187–93.
- Bartges, J., & Polzin, D. J. (2013). Centellografía Renal. In *Nefrología y Urología de Pequeños Animales. Tomo 1.* (pp. 164–175). Buenos Aires. Argentina: Intermedica.
- Behrend, E. N. (2015). Canine Hyperadrenocorticism. In *Canine and Feline Endocrinology-Fourth Edition.* Feldman, E.C., Nelson, R.W., Reusch, C.E., Scott-Moncrieff, J.C.R, Behrend, E.N. (Fourth Edi, p. Chapter 10: 377-451). USA: Elsevier Saunders.
- Behrend, E. N., Weigand, C. M., Whitley, E. M., Refsal, K. R., Young, D. W., & Kemppainen, R. J. (2005). Corticosterone and aldosterone-secreting adrenocortical tumor in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 226, 1662–1666.
- Bigazzi, R., Bianchi, S., Baldari, D., & Campese, V. M. (1998). Microalbuminuria predicts cardiovascular events and renal insufficiency in patients with essential hypertension. *Journal of Hypertension*, 16(9), 1325–1333.
- Birgitta Sundell, I., Nilsson, T. K., Hallmans, G., Hellsten, G. I., & Dahlén, G. H. (1989). Interrelationships between plasma levels of plasminogen activator inhibitor, tissue plasminogen activator, lipoprotein (a), and established cardiovascular risk factors in a North Swedish population. *Atherosclerosis*, 80(1), 9–16.
- Bisgaier, C. L., Chanderbhan, R., Hinds, R. W., & Vahouny, G. V. (1985). Adrenal cholesterol esters as substrate source for steroidogenesis. *J. Steroid. Biochem.*, 23, 967–974.
- Bodey, A. R., & Michell, A. R. (1996). Epidemiological study of blood pressure in domestic dogs. *Journal of Small Animal Practicel*, 37, 116–125.
- Bornstein, S. R., Engeland, W. C., Ehrhart-Bornstein, M., & Herman, J. P. (2008). Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrin. Met.*, 19, 175–180.
- Boscaro, M., Giacchetti, G., & Ronconi, V. (2012). Visceral adipose tissue: Emerging role of gluco- and mineralocorticoid hormones in the setting of cardiometabolic alterations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1264(1), 87–102.
- Boscaro, M., Sonino, N., Scarda, A., Barzon, L., Fallo, F., Sartori, M. T., ... Girolami, A. (2002). Anticoagulant Prophylaxis Markedly Reduces Thromboembolic Complications in Cushing's Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(8), 3662–3666.
- Bosje, J., Rijnberk, A., Mol, J., Voorhout, G., & Kooistra, H. (2002). Plasma concentrations of ACTH precursors correlate with pituitary size and resistance to dexamethasone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Domest.*

- Anim. Endocrin.*, 22, 201–210.
- Boswood, A. (2008). Las valvulopatías en el perro. *Veterinary Focus*, 18 (3), 25–31.
- Boswood, A., Lamb, C. R., & White, R. N. (2000). Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 41(3), 109–114.
- Bousquet, C., Ray, D. W., & Melmed, S. (1997). A Common Pro-opiomelanocortin-binding Element Mediates Leukemia Inhibitory Factor and Corticotropin-releasing Hormone Transcriptional Synergy. *J. Biol. Chem.*, 272, 10551–10557.
- Bradbury, M. J., Akana, S. F., & Dallman, M. F. (1994). Roles of type I and II corticosteroid receptors in regulation of basal activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the diurnal trough and the peak: evidence for a non additive effect of combined receptor occupation. *Endocrinology*, 134, 1286–96.
- Brinkmeier, M. L., Davis, S. W., Carninci, P., MacDonald, J. W., Kawai, J., Ghosh, D., ... Camper, S. A. (2009). Discovery of transcriptional regulators and signaling pathways in the developing pituitary gland by bioinformatic and genomic approaches. *Genomics*, 93, 449–460.
- Brott, D. A., Katein, A., Thomas, H., Lawton, M., Montgomery, R. R., Richardson, R. J., & Loudon, C. S. (2014). Evaluation of von Willebrand Factor and von Willebrand Factor Propeptide in Models of Vascular Endothelial Cell Activation, Perturbation, and/or Injury. *Toxicologic Pathology*, 42(4), 672–683.
- Brown, M. S., Kovanen, P. T., & Goldstein, J. L. (1979). Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog. Horm. Res.*, 35, 215–257.
- Brown, N. J., Agirbasli, M., & Vaughan, D. E. (1999). Comparative effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on plasma fibrinolytic balance in humans. *Hypertension*.
- Brown, S. A., Finco, D. R., Brown, C. A., Crowell, W. A., Alva, R., Ericsson, F. G., & Cooper, T. (2003). Evaluation of the effects of inhibition of angiotensin converting enzyme with enalapril in dogs with induced chronic renal insufficiency. *American Journal of Veterinary Research*, 64(3), 321–327.
- Brown, S., Atkins, C., Bagley, R., Carr, A., Cowgill, L., Davidson, M., ... Stepien, R. (2007). Guidelines for the Identification , Evaluation , and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med*, 21, 542–558.
- Brown, S., Elliott, J., Francey, T., Polzin, D., & Vaden, S. (2013). Consensus recommendations for standard therapy of glomerular disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 27–43.
- Bryson, C. L., & Psaty, B. M. (2002). A Review of the Adverse Effects of Peripheral Alpha-1 Antagonists in Hypertension Therapy. *Curr Control Trials Cardiovasc*

- Med*, 3(1), 1–7.
- Burgess, L. H., & Handa, R. J. (1992). Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor mediated functions in female rats. *Endocrinology*, 131, 1261–1269.
- Burns, M. G., Kelly, A. B., Hornof, W. J., & Howerth, E. W. (1981). Pulmonary artery thrombosis in three dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
- Cabrera Blatter, M. F., del Prado, A., Gallelli, M. F., D'Anna, E., Ivanic, J., Esarte, M., ... Castillo, V. A. (2011). Blindness in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism: Relationship with glucose, cortisol and triglyceride concentration and with ophthalmic blood flow. *Research in Veterinary Science*, 92(3), 387–392.
- Cabrera Blatter, M. F., del Prado, B., Miceli, D. D., Gomez, N., Ivanic, J., Di Tollo, B., ... Castillo, V. A. (2012). Interleukin-6 and insulin increase and nitric oxide and adiponectin decrease in blind dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1195–1202.
- Carmassi, F., Morale, M., Ferrini, L., Omo, G. L., Ferdeghini, M., Pedrinelli, R., & De Negri, F. (1999). Local Insulin Infusion Stimulates Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Tissue-type Plasminogen Activator in Normal Subjects. *The American Journal of Medicine*, 107(4), 344–350.
- Carmines, P. K., Perry, M. D., Hazelrig, J. B., & Navar, L. G. (1987). Effects of preglomerular and postglomerular vascular resistance alterations on filtration fraction. *Kidney International*, 20, S229–S232.
- Casonato, A., Pontara, E., Boscaro, M., Sonino, N., Sartorello, F., Ferasin, S., & Girolami, A. (1999). Abnormalities of von Willebrand factor are also part of the prothrombotic state of Cushing's syndrome. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: Internaltional Journal in Haemostasis and Thrombosis*.
- Castillo, V. A., Cabrera Blatter, M. F., Gómez, N. V., Sinatra, V., Gallelli, M. F., & Ghersevich, M. C. (2009). Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Res. Vet. Sci.*, 86, 223–229.
- Castillo, V. A., Giacomini, D., Páez-Pereda, M., Stalla, J., Labeur, M., Theodoropoulou, M., ... Arzt, E. (2006). Retinoic acid as a novel medical therapy for Cushing's disease in dogs. *Endocrinology*, 147(9), 4438–4444.
- Castillo, V. A., Gómez, N. V., Lalia, J. C., Cabrera Blatter, M. F., & García, J. D. (2008). Cushing's disease in dogs: Cabergoline treatment. *Research in Veterinary Science*, 85(1), 26–34.

- Castillo, V. A., Pessina, P. P., Garcia, J. D., Hall, P., Gallelli, M. F., Miceli, D. D., & Cabrera Blatter, M. F. (2014). Ectopic ACTH syndrome in a dog with a mesenteric neuroendocrine tumour : a case report. *Veterinarni Medicina*, 59 (7), 352–358.
- Chairperson, A. T., Perrier, A., Konstantinides, S., Agnelli, G., Galiè, N., Pruszczyk, P., ... Bassand, J. P. (2008). Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *European Heart Journal*, 29(18), 2276–2315.
- Chandran, D. S., Jaryal, A. K., Jyotsna, V. P., & Deepak, K. K. (2011). Impaired endothelium mediated vascular reactivity in endogenous Cushing's syndrome. *Endocrine Journal*, 58(9), 789–799.
- Chang, D., Li, G., Peng, C., Yu, X., Zhang, P., Bi, M., ... Yang, X. (2015). Longbishu Capsule combined with mesylate doxazosin: an efficacious therapy for benign prostatic hyperplasia. *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology*.
- Chapman, N., Chen, C. Y., Fujita, T., Hobbs, F. R., Kim, S. J., Staessen, J. A., ... Williams, B. (2010). Time to re-appraise the role of alpha-1 adrenoceptor antagonists in the management of hypertension? *Journal of Hypertension*, 28(9), 1796–1803.
- Chen, J., Muntner, P., Hamm, L., Jines, W. D., Batuman, V., Fonseca, V., ... He, J. (2004). The Metabolic Syndrome and Chronic Kidney Disease in U.S. Adults. *Annals of Internal Medicine*, 140, 167.
- Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H., & Vale, W. W. (1993). Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 8967–8971.
- Chetboul, V., Daste, T., Gouni, V., Concordet, D., Trehou-Sechi, E., Serres, F., ... Lefebvre, H. P. (2012). Renal resistive index in 55 dogs with degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(1), 101–8.
- Christopoulos, S., Bourdeau, I., & Lacroix, A. (2005). Aberrant Expression of Hormone Receptors in Adrenal Cushing ' s Syndrome. *Pituitary*, 7, 231–241.
- Chung, B.C., Guo, I.C., Chou, S. J. (1997). Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes. *Steroids*, 62, 37–42.
- Cianciolo, R., Hokamp, J., & Nabity, M. (2016). Advances in the evaluation of canine renal disease. *The Veterinary Journal*, 215, 21–29.
- Cicala, M. V., & Mantero, F. (2010). Hypertension in Cushing's syndrome: From pathogenesis to treatment. *Neuroendocrinology*, 92(suppl 1), 44–49.
- Cintra, A., Bhatnagar, M., Chadi, G., Tinner, B., Lindberg, J., Gustafsson, J. A., ... Fuxe, K. (1994). Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 746, 42–63.

- Colao, A., Lombardi, G., & Annunziato, L. (2000). Cabergoline. *Experimental Opinion Pharmacotherapy*, 1, 555–574.
- Cole, R. L., & Sawchenko, P. E. (2002). Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neurosci.*, 22, 959–969.
- Constancia, M., Angiolini, E., Sandovici, I., Smith, P., Smith, R., Kelsey, G., ... Fowden, A. (2005). Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 19219–19224.
- Cook, A. K., & Cowgill, L. D. (1996). Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). *J Am Anim Hosp Assoc*, 32, 313–322.
- Cortadellas, O., & Fernández-del Palacio, M. J. (2012). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica (ERC) en el perro y el gato. Part 2 : manejo del paciente con ERC. *Clin. Vet. Peq. Anim*, 32(4), 225–233.
- Daidone, V., Boscaro, M., Pontara, E., Cattini, M. G., Occhi, G., Scaroni, C., ... Casonato, A. (2011). New insight into the hypercoagulability of Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*, 93(2), 121–125.
- Davis, S. W., & Camper, S. A. (2007). Noggin regulates Bmp4 activity during pituitary induction. *Dev. Biol.*, 305, 145–160.
- Davis, S. W., Castinetti, F., Carvalhoc, L. R., Ellsworth, B. S., Potok, M. A., Lyons, R. H., ... Camper, S. A. (2010). Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: In search of novel regulatory genes. *Mol. Cell Endocrinol.*, 323, 4–19.
- De Bruin, C., Feelders, R. A., Lamberts, S. W. J., & Hofland, L. J. (2009). Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Dis.*, 42, 47–56.
- De Jong, P. E., & Gansevoort, R. T. (2009). Focus on microalbuminuria to improve cardiac and renal protection. *Nephron Clin Pract*, 111, 204–211.
- de Laforcade, A. (2012). Diseases associated with thrombosis. *Topics in Companion Animal Medicine*, 27(2), 59–64.
- de Leeuw, P. W., Van Es, P. N., de Bos, R., & Birkenhager, W. H. (1986). Acute renal effects of doxazosin in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 21(1 S), 41S–43S.
- Dellas, C., & Loskutoff, D. J. (2005). Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 95, 631–40.
- Denton, K. M., Li, M., Anderson, W. P., & Whitworth, J. A. (2001). Glomerular

- hypertension and hyperfiltration in adrenocorticotrophin-induced hypertension in rats: the role of nitric oxide. *Journal of Hypertension*, 19, 327–334.
- Dewhurst, E., Cue, S., Crawford, E., & Pappasoulotis, K. (2008). A retrospective study of canine D-dimer concentrations measured using an immunometric “Point-of-Care” test. *Journal of Small Animal Practice*, 49(7), 344–348.
- Dickinson, H., Walker, D. W., Wintour, E. M., & Moritz, K. (2007). Maternal dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters renal gene expression in the fetal spiny mouse. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292, R453–R461.
- Don, S., Kopecky, K. K., Filo, R. S., Leapman, S. B., Thomalla, J. V., Jones, J. A., & Klatte, E. C. (1989). Duplex Doppler US of Renal Allografts : Causes of Elevated Resistive Index. *Radiology*, 171, 709–712.
- Donahue, S. M., Brooks, M., & Otto, C. M. (2011). Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein-losing nephropathy. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 21(4), 346–55.
- Dubois, P. M., & Hemming, F. J. (1991). Fetal development and regulation of pituitary cell types. *J. Electron. Microsc. Tech.*, 19, 220.
- Duprez, D. A. (2004). Angiotensin II, platelets and oxidative stress. *Journal of Hypertension*, 22, 1085–1086.
- Duprez, D. A. (2006). Role of the renin – angiotensin – aldosterone system in vascular remodeling and inflammation : a clinical review. *Journal of Hypertension*, 24, 983–991.
- Duprez, D., De Buyzere, M., Rietzschel, E. R., & Clement, D. L. (2000). Aldosterone and vascular damage. *Current Hypertension Reports*, 2(3), 327–334.
- Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J., Bornstein, S., Scherbaum, W., & Vinso, G. (1998). Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocr. Rev.*, 19, 101–143.
- El Ghorayeb, N., Bourdeau, I., & Lacroix, A. (2015). Multiple aberrant hormone receptors in Cushing’s syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 173, M45–M60.
- Ellsworth, B. S., Butts, D. L., & Camper, S. A. (2008). Mechanisms underlying pituitary hypoplasia and failed cell specification in Lhx3-deficient mice. *Dev. Biol.*, 313, 118–129.
- Endemann, D. H., & Schiffrin, E. L. (2004). Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(8), 1983–92.
- Epstein, S. E., Hopper, K., Mellema, M. S., & Johnson, L. R. (2013). Diagnostic Utility of D-Dimer Concentrations in Dogs with Pulmonary Embolism. *J Vet Intern Med*,

27(2), 1646–1649.

- Erem, C., Nuhoglu, I., Ylmaz, M., Kocak, M., Demirel, A., Ucuncu, O., & Ersoz Onder, H. (2009). Blood coagulation and fibrinolysis in patients with Cushing ' s syndrome : Increased plasminogen activator inhibitor-1 , decreased tissue factor pathway inhibitor , and unchanged thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels. *Journal Endocrinology Invest.*, 32, 1–6.
- Ericson, J., Norlin, S., Jessell, T. M., & Edlund, T. (1998). Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development*, 125, 1005–1015.
- Evans, H. ., & de Lahunta, A. (2013). *Miller's anatomy of the dog*. (Elsevier, Ed.) (4th ed.). Missouri.
- Fatti, L. M., Bottasso, B., Invitti, C., Coppola, R., Cavagnini, F., & Mannucci, P. M. (2000). Markers of activation of coagulation and fibrinolysis in patients with Cushing ' s syndrome. *Journal Endocrinology Invest.*, 23, 145–150.
- Faust, J. R., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1977). Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells. *J. Biol. Chem.*, 252, 4861–4871.
- Feelders, R. A., Pulgar, S. J., Kempel, A., & Pereira, A. M. (2012). The burden of Cushing's disease: clinical and health-related quality of life aspects. *European Journal of Endocrinology*, 167, 311–26.
- Feldman, B. F., Rasedee, A., & Feldman, E. C. (1986). Haemostatic abnormalities in canine Cushing's syndrome. *Research in Veterinary Science*.
- Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (2004). Canine hyperadrenocorticism (Cushing's syndrome). In Elsevier (Ed.), *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Third Edition* (3th ed., pp. 252–357). St. Louis.
- Ferone, D., Gatto, F., Arvigo, M., Resmini, E., Boschetti, M., Teti, C., ... Minuto, F. (2009). The clinical–molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J. Mol. Endocrinol.*, 42, 361–370.
- Finco, D. R. (2004). Association of Systemic Hypertension with Renal Injury in Dogs with Induced Renal Failure. *J Vet Intern Med*, 18, 289–294.
- Flores-Rivera, O. I., Meza-Márquez, J. M., Nava-López, J. A., & Ramírez-Morales, K. (2014). Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 37, S382–S386.
- Ford, S. L., Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (1993). Hyperadrenocorticism caused by bilateral adrenocortical neoplasia in dogs: Four cases (1983-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 202, 789–792.

- Fottner, C., Hoeflich, A., Wolf, E., & Weber, M. M. (2004). Role of the Insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. *Horm. Metab. Res.*, 36, 397–405.
- Fragoso, M. C., Alencar, G. A., Lerario, A. M., Bourdeau, I., Almeida, M. Q., Mendonca, B. B., & Lacroix, A. (2015). Genetics of primary macronodular adrenal hyperplasia. *J Endocrinol.*, 224(1), R31-43.
- Fuglsang, J., & Ovesen, P. (2006). Aspects of placental growth hormone physiology. *Growth Horm. IGF Res.*, 16, 67–85.
- Fukuoka, H., Takeuchi, T., Matsumoto, R., Bando, H., & Suda, K. (2014). D-dimer as a significant marker of deep vein thrombosis in patients with subclinical or overt Cushing ' s syndrome, 61(10), 1003–1010.
- Fuller, P. J., & Young, M. J. (2005). Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension*, 46(6), 1227–1235.
- Galac, S., Buijtel, J. J., Mol, J. A., & Kooistra, H. S. (2010). Effects of trilostane on the pituitary-adrenocortical and renin-aldosterone axis in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. *Veterinary Journal*, 183(1), 75–80.
- Galac, S., Kars, V. J., Voorhout, G., Mol, J. A., & Kooistra, H. S. (2008). ACTH-independent hyperadrenocorticism due to food-dependent hypercortisolemia in a dog: a case report. *Vet. J.*, 177(1), 141–3.
- Galac, S., Kooistra, H. S., Teske, E., & Rijnberk, A. (1997). Urinary corticoid/creatinine ratios in the differentiation between pituitary-dependent hyperadrenocorticism and hyperadrenocorticism due to adrenocortical tumour in the dog. *Vet Quart*, 19, 17–20.
- Galac, S., Kooistra, H. S., Voorhout, G., Van den Ingh, T. S., Mol, J. A., & Van den Berg, G., Meij, B. . (2005). Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 28(3), 338–48.
- Gallelli, M. F. (2015). “*Estudio del área corticotropa del perro en relación al sexo y variaciones estacionales.*” Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Gallelli, M. F., Cabrera Blatter, M. F., & Castillo, V. (2010). A comparative study by age and gender of the pituitary adenoma and ACTH and alpha-MSH secretion in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Research in Veterinary Science*, 88, 33–40.
- García-Iglesias, B. B., Mendoza-Garrido, M.E. Gutierrez-Ospina, G., Rangel-Barajas, C., Noyola-Diaz, M., & Terron, J. A. (2013). Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: Involvement of 5-HT receptors. *Neuropharmacology*, 71C, 216–227.

- Giblin, J. P., Hewlett, L. J., & Hannah, M. J. (2008). Basal secretion of von willebrand factor from human endothelial cells. *Blood*, *112*(4), 957–964.
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology* (6th ed.). Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.
- Goggs, R., Chan, D. L., Benigni, L., Hirst, C., Kellett-Gregory, L., & Fuentes, V. L. (2014). Comparison of computed tomography pulmonary angiography and point-of-care tests for pulmonary thromboembolism diagnosis in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, *55*(4), 190–197.
- Gomez-Sanchez, E. P., Ahmad, N., Romero, D. G., & Gomez-Sanchez, C. E. (2005). Is aldosterone synthesized within the rat brain? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *288*(2), E342–E346.
- Gonçalves Pupe, C., Almada Do Carmo, F., Pereira De Sousa, V., Lopes, M., Abraham-Vieira, B., Ribeiro, A. J., ... Mendes Cabral, L. (2013). Development of a doxazosin and finasteride transdermal system for combination therapy of benign prostatic hyperplasia. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *102*(11), 4057–4064.
- Good, D. W. (2007). Nongenomic actions of aldosterone on the renal tubule. *Hypertension*, *49*(4), 728–739.
- Goy-Thollot, I., Péchereau, D., Kéroack, S., Dezempte, J. C., & Bonnet, J. M. (2002). Investigation of the role of aldosterone in hypertension associated with spontaneous pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, *43*, 489–492.
- Grauer, G. F., Greco, D. S., Getzy, D. M., Cowgill, L. D., Vaden, S. L., Chew, D. J., ... Barsanti, J. A. (2000). Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *14*(5), 526–533.
- Haentjens, P., De Meirleir, L., Abs, R., Verhelst, J., Poppe, K., & Velkeniers, B. (2005). Glomerular filtration rate in patients with Cushing's disease: a matched case-control study. *European Journal of Endocrinology*, *153*, 819–829.
- Halasz, B. (1994). Hypothalamo-anterior pituitary system and pituitary portal vessels. In H. In Imura (Ed.), *The Pituitary Gland* (p. 128). New York: Raven Press.
- Hall, J. E., Guyton, A. C., Jackson, T. E., Coleman, T. G., Lohmeier, T. E., & Trippodo, N. C. (1977). Control of glomerular filtration rate by renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *233*(5), F366–F372.
- Handa, R. J., & Weiser, M. J. (2014). Gonadal Steroid Hormones and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Front. Neuroendocrin.*, *35*, 97–220.
- Hanson, J. M., Mol, J. A., & Meij, B. P. (2010). Expression of leukemia inhibitory factor and leukemia inhibitory factor receptor in the canine pituitary gland and

- corticotrope adenomas. *Dom. Anim. Endocr.*, 38, 260–271.
- Heaney, A. P., Hunter, S. J., Sheridan, B., & Atkinson, A. B. (1999). Increased pressor response to noradrenaline in pituitary dependent Cushing's syndrome. *Clinical Endocrinology*, 51, 293–299.
- Heisler, L. K., Pronchuk, N., Nonogaki, K., Zhou, L., Raber, J., Tung, L., ... Tecott, L. H. (2007). Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *J. Neurosci.*, 27, 6956–6964.
- Herman, J. P., & Cullinan, W. E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trend. Neurosci.*, 20, 78–84.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrin.*, 24, 151–180.
- Herman, J. P., Wiegand, S. J., & Watson, S. J. (1990). Regulation of basal corticotrophin releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus: effects of selective hypothalamic deafferentations. *Endocrinology*, 127, 2408–2417.
- Hill, K. E., Scott-moncrieff, J. C. ., Koshko, M. ., Glickman, L. ., Glickman, N. ., Nelson, R. ., ... Oliver, J. . (2005). Secretion of sex hormones in dogs with adrenal dysfunction. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 226(4), 556–561.
- Hoerauf, A., & Reusch, C. E. (1999). Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc*, 35, 193–199.
- Holdaas, H., Hartmann, A., Berg, K. J., Langberg, H., Blystad, L., & Fauchald, P. (1995). Contrasting effects of angiotensin converting inhibitor and alpha-1-antagonist on albuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus patients with nephropathy. *J. Intern. Med.*, 237, 63–71.
- Holmes, R. L., & Ball, J. N. (1974). *The pituitary gland: a comparative account*. Cambridge: University Press.
- Horita, S., Seki, G., Yamada, H., Suzuki, M., Nakamura, M., & Fujita, T. (2011). Metabolic syndrome and insulin signaling in kidney. *Endocrinology & Metabolic Syndrome*, 01(S1), 1–5.
- Hough, B., Storbeck, K., Cloete, S. W. P., Swart, A. C., & Swart, P. (2015). Relative contribution of P450c17 towards the acute cortisol response: Lessons from sheep and goats. *Moll. Cell Endocrinol.*, 1–7.
- Hu, M. C., Hsu, N. C., Pai, C. I., Wang, C. K., & Chung, B. C. (2001). Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1

- promoter in basal transcription and hormonal response. *Mol. Endocrinol.*, 15, 812–818.
- Hurley, K. J., & Vaden, S. L. (1998). Evaluation of urine protein content in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 212, 369–373.
- Ingaramo, R. A. (2003). El eco-Doppler renal y su utilidad en la hipertensión arterial. *Rev Fed Arg Cardiol*, 32, 487–490.
- Inoue, K., Couch, E. F., Takano, K., & Ogawa, S. O. (1999). The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch. Histol. Cytol.*, 62, 205–218.
- Isidori, A. M., Graziadio, C., Paragliola, R., Cozzolino, A., Ambrogio, A. G., Colao, A., ... Pivonello, R. (2015). The hypertension of Cushing's syndrome: controversies in the pathophysiology and focus on cardiovascular complications. *Journal of Hypertension*, 33(1), 44–60.
- Isidori, A. M., Minnetti, M., Sbardella, E., Graziadio, C., & Grossman, A. B. (2015). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: The spectrum of haemostatic abnormalities in glucocorticoid excess and defect. *European Journal of Endocrinology*, 173(3), R101–R113.
- Iuchi, T., Akaike, M., Mitsui, T., Ohshima, Y., Shintani, Y., Azuma, H., & Matsumoto, T. (2003). Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circulation Research*, 92(1), 81–87.
- Jacoby, R. C., Owing, J. T., Ortega, T., Gosselin, R., & Feldman, E. C. (2001). Biochemical Basis for the Hypercoagulable State Seen in Cushing Syndrome. *Arch Surg*, 136, 1003–1007.
- Janssen, S. F., Twickler, T. B., Jublanc, C., Cramer, M. J., & Bruckert, E. (2008). Patients with the metabolic syndrome and a disturbed cortisol balance display more microalbuminuria. *Diabetes & Vascular Disease Research: Official Journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, 5, 54–58.
- Javadi, S., Kooistra, H. S., Mol, J. A., Boer, P., Boer, W. H., & Rijnberk, A. (2003). Plasma aldosterone concentrations and plasma renin activity in healthy dogs and dogs with hyperadrenocorticism. *The Veterinary Record*, 153, 521–525.
- Jekell, A., Kalani, M., & Kahan, T. (2017). The effects of alpha 1-adrenoceptor blockade and angiotensin converting enzyme inhibition on central and brachial blood pressure and vascular reactivity: the doxazosin–ramipril study. *Heart and Vessels*, 32(6), 674–684.
- Joles, J. A. (1998). Obesity in dogs: effects on renal function, blood pressure, and renal

- disease. *The Veterinary Quarterly*, 20(4), 117–20.
- Juhan-Vague, I., Alessi, M. C., Mavri, A., & Morange, P. E. (2003). Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 1(7), 1575–1579.
- Julious, S. A. (2005). Sample size of 12 per group rule of thumb for a pilot study. *Pharmaceutical Statistics*, 4(4), 287–291.
- Jyothirmayi, G. N., Alluru, I., & Reddi, A. S. (1996). Doxazosin prevents proteinuria and glomerular loss of heparan sulfate in diabetic rats. *Hypertension*, 27(5), 1108–14.
- Kanazawa, M., Kohzuki, M., Kurosawa, H., Minami, N., Ito, O., Saito, T., ... Abe, K. (2004). Renoprotective Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Combined with alfa1 -Adrenergic Antagonist in Spontaneously Hypertensive Rats with Renal Ablation. *Hypertension Research*, 27, 509–515.
- Kasiske, B. L., O'Donnell, M. P., Garvis, W. J., & Keane, W. F. (1988). Pharmacologic treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in rat 5/6 nephrectomy model of chronic renal failure. *Circulation Research*, 62(2), 367–374.
- Kastelan, D., Dusek, T., Kraljevic, I., Polasek, O., Giljevic, Z., Solak, M., ... Korsic, M. (2009). Hypercoagulability in Cushing's syndrome: The role of specific haemostatic and fibrinolytic markers. *Endocrine*, 36(1), 70–74.
- Kauffmann, R. H., De Graeff, J., Brutel del la Rivière, G., & Van Es, L. A. (1976). Unilateral renal vein thrombosis and nephrotic syndrome. Report of a case with protein selectivity and antithrombin III clearance studies. *American Journal of Medicine*, 60, 1048–1054.
- Kauffmann, R. H., Veltkamp, J. J., Van Tilburg, N. H., & Van Es, L. A. (1978). Acquired antithrombin III deficiency and thrombosis in the nephrotic syndrome. *The American Journal of Medicine*, 65(4), 607–613.
- Kawamura, K., Kouki, T., Kawahara, G., & Kikuyama, S. (2002). Hypophyseal Development in Vertebrates from Amphibians to Mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 126, 130–135.
- Kealy, J. K., McAllister, H., & Graham, J. P. (2011). *Diagnostic radiology and ultrasonography of the dog and cat*. (Elsevier, Ed.) (5th ed.). Missouri.
- Kempainen, R. J., & Sartin, R. L. (1984). Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *J. Endocrinol.*, 103, 219–225.
- Kempainen, R. J., Zerbe, C. A., & Sartin, J. L. (1989). Regulation and secretion of proopiomelanocortin peptides from isolated perfused dog pituitary pars intermedia cells. *Endocrinology*, 124, 2208–2217.
- Kimura, G., Kasahara, M., Ueshima, K., Tanaka, S., Yasuno, S., Fujimoto, A., ...

- Nakao, K. (2017). Effects of atorvastatin on renal function in patients with dyslipidemia and chronic kidney disease: assessment of clinical usefulness in CKD patients with atorvastatin (ASUCA) trial. *Clinical and Experimental Nephrology*, 21(3), 417–424.
- Kitazawa, S., Shioda, S., & Nakai, Y. (1987). Catecholaminergic innervation of neurons containing corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Acta Anat.*, 129, 337–343.
- Klose, T. C., Creevy, K. E., & Brainard, B. M. (2011). Evaluation of coagulation status in dogs with naturally occurring canine hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 21(6), 625–32.
- Knoepfelmacher, M., Pradal, M. J., Di Dio, R., Salgado, L. R., Semer, M., Wajchenberg, B. L., & Liberman, B. (1997). Resistance to vasopressin action on the kidney in patients with Cushing's disease. *European Journal of Endocrinology*, 137, 162–166.
- Kobayashi, H., Yamaguichi, Y., & Uemura, H. (1999). The median eminence. A mediator in the regulation of the pituitary by the brain. In I. P. R. and Peter (Ed.), *“Neural Regulation in the Vertebrate Endocrine System.”* (pp. 1–22). Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Koeppen, B. M., & Stanton, B. . (2010). *Berne & Levy Physiology*. (Elsevier, Ed.) (6th ed.). St. Louis.
- Kooistra, H. S., & Galac, S. (2012). Recent Advances in the Diagnosis of Cushing's Syndrome in Dogs. *Topics in Compan An Med*, 27, 21–24.
- Kooistra, H. S., Galac, S., Buijtel, J. J. C. W. M., & Meij, B. P. (2009). Endocrine diseases in animals. *Hormone Research*, 71(SUPPL. 1), 144–147.
- Kooistra, H. S., Voorhout, G., Mol, J. A., & Rijnberk, A. (1997). Correlation between impairment of glucocorticoid feedback and the size of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Endocrinol.*, 152, 387–394.
- Lacroix, A., N'Diaye, N., Tremblay, J., & Hamet, P. (2001). Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocrine Reviews*, 22, 75–110.
- Lafarque, M., Oliveros, L., & Aguado, L. (1998). Efecto de secreciones de pars tuberalis de la adenohipófisis sobre la liberación de prolactina desde pars distalis. *Medicina*, 58, 36–40.
- Laurenson, M. P., Hopper, K., Herrera, M. A., & Johnson, E. G. (2010). Concurrent diseases and conditions in dogs with splenic vein thrombosis. *J Vet Intern Med*, 24, 1298–1304.
- Lee, K. S., Han, T. H., Jo, J. Y., Kang, G., Lee, S. Y., Ryu, P. D., ... Park, J. B. (2008).

- Serotonin inhibits GABA synaptic transmission in presympathetic paraventricular nucleus neurons. *Neurosci. Lett.*, 439, 138–142.
- Lees, G. E., Brown, S. A., Elliott, J., Grauer, G. . . , & Vaden, S. L. (2005). Assessment and Management of proteinuria in dogs and cats. *J Vet Intern Med*, 19, 377–385.
- Li, Q., Jansen, E., & Friedman, T. C. (1999). Regulation of prohormone convertase 1 (PC1) by gp130-related cytokines. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 158, 143–152.
- Lien, Y. H., Hsiang, T. Y., & Huang, H. P. (2010). Associations among systemic blood pressure, microalbuminuria and albuminuria in dogs affected with pituitary- and adrenal-dependent hyperadrenocorticism. *Acta Vet Scand*, 52, 1–6.
- Loscalzo, J. (1995). Nitric Oxide and Vascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, 333(4), 251–253.
- Luo, X., Ikeda, Y., & Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear factor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77, 481–490.
- Machida, T., Uchida, E., Matsuda, K., Hirayama, K., Yoshii, K., Takiguchi, M., & Taniyama, H. (2008). Aldosterone-, corticosterone- and cortisol-secreting adrenocortical carcinoma in a dog: case report. *J. Vet. Med. Sci.*, 70, 317–320.
- Magiakou, M. A., Smyrnaki, P., & Chrousos, G. P. (2006). Hypertension in Cushing's syndrome. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20(3), 467–482.
- Majluf-Cruz, A., & Espinosa-Larrañag, F. (2007). Fisiopatología de la trombosis. *Gaceta Medica de Mexico*, 143(SUPPL. 1), 11–14.
- Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Reimers, J. I., Pociot, F., Andersen, H. U., Karlsen, A., ... Bergholdt, R. (1995). Cytokines and the endocrine system. I. The immunoendocrine network. *Eur. J. Endocrinol.*, 133, 660–671.
- Manetti, L., Bogazzi, F., Giovannetti, C., Raffaelli, V., Genovesi, M., Pellegrini, G., ... Martino, E. (2010). Changes in coagulation indexes and occurrence of venous thromboembolism in patients with Cushing's syndrome: results from a prospective study before and after surgery. *European Journal of Endocrinology*, 163(5), 783–91.
- Marshall, T., & Williams, K. M. (1998). Clinical analysis of human urinary proteins using high resolution electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 19, 1752–1770.
- Martiarena, B., Madalena, L., Mira, G., Fianza, M., Lalia, J., Ortemberg, L., ... Castillo, V. (2007). Evaluación de la proteinuria en perros con Enfermedad de Cushing, previo y posterior al tratamiento con Ácido Retinoico y Ketoconazol. *An. Vet. (Murcia)*, 23, 45–54.
- McGimsey, W. C., Cidlowski, J. A., Stumpf, W. E., & Sar, M. (1991). Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain,

- pituitary, liver, and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology*, 129, 3064–3072.
- Melmed, S. (2003). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J. Clin. Invest.*, 112, 1603–1618.
- Mendonca, B. B., Lucon, A. M., Menezes, C. A. V., Saldanha, L. B., Latronico, A. C., Zerbini, C., ... Camargo, M. H. (1995). Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenal cortical neoplasms in childhood and adulthood. *J. Urol.*, 154, 2004–2009.
- Mesiano, S., & Jaffe, R. B. (1997). Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr. Rev.*, 18, 378–403.
- Miceli, D. D., Cabrera Blatter, M. F., Gallelli, M. F., Pignataro, O. P., & Castillo, V. A. (2014). Involvement of glucagon-like peptide 1 in the glucose homeostasis regulation in obese and pituitary-dependent hyperadrenocorticism affected dogs. *Research in Veterinary Science*, 97, 211–217.
- Michel, M. C., & Rump, L. C. (1996). alpha-Adrenergic regulation of human renal function. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 10(6), 493–503.
- Miller, W. L. (2007). StAR search – what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol. Endocrinol.*, 21, 589–601.
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Res.*, 32, 81–151.
- Mitchell, B. M., & Webb, R. C. (2002). Impaired Vasodilation and Nitric Oxide Synthase Activity in Glucocorticoid-Induced Hypertension. *Biological Research For Nursing*, 4, 16–21.
- Mollard, P., Hodson, D. J., Lafont, C., Rizzoti, K., & Drouin, J. (2012). A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrin. Met.*, 23, 261–269.
- Monreal, L. (2003). D-dimer as a new test for the diagnosis of DIC and thromboembolic disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(6), 757–759.
- Mori, Y., Matsubara, H., Nose, A., & Shibasaki, Y. (2001). Safety and availability of Doxazosin in treating hypertensive patients with chronic renal failure. *Hypertension Research*, 24, 359–363.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., & Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.*, 26, 235–69.
- Morrow, L. K., Salman, D. M., Lappin, R. M., & Wrigley, R. (1996). Comparison of the resistive index to clinical parameters in dogs with renal disease. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 37(3), 193–199.

- Nelson, O. L. (2005). Use of the D-dimer assay for diagnosing thromboembolic disease in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 41(3), 145–149.
- Nelson, O. L., & Andreasen, C. (2003). The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(6), 830–834.
- Netter, F. H. (2010). *Atlas of Human Anatomy*. (Saunders/Elsevier, Ed.). Philadelphia.
- Newell-price, J., Bertagna, X., Grossman, A. B., & Nieman, L. K. (2006). Cushing ' s syndrome. *The Lancet*, 367, 1605–17.
- Nicholson, S., Lin, J. H., Mahmoud, S., Campbell, E., Gillham, B., & Jones, M. (1985). Diurnal variations in responsiveness of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis of the rat. *Neuroendocrinology*, 40, 217–224.
- Norris, D. O. (2007). *Vertebrate endocrinology*. (Elsevier Academic, Ed.) (4th ed.). USA.
- Novellas, R., Espada, Y., & De Gopegui, R. R. (2007). Doppler Ultrasonographic Estimation of Renal and Ocular Resistive and Pulsatility Indices in Normal Dogs and Cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 48(1), 69–73.
- Novellas, R., Ruiz de Gopegui, R., & Espada, Y. (2008). Determination of renal vascular resistance in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Veterinary Record*, 163, 592–596.
- O'Dwyer, L. (2015). Thromboembolic disease in dogs and cats. *Veterinary Nursing Journal*, 30(4), 118–121.
- Obiols Alfonso, G., Biagetti Biagetti, B., Chacón Oreja, A., & Salvador Rodríguez, J. (2014). La enfermedad de Cushing en 2012. *Endocrinología y Nutrición*, 61(2), 93–99.
- Oikarinen, A., Höyhty, M., & Järvinen, M. (1990). Dexamethasone-induced plasminogen activator inhibitor: characterization, purification, and preparation of monoclonal antibodies. *Archives of Dermatological Research*, 282(3), 153–8.
- Okamoto, M., & Takemori, H. (2000). Differentiation and zonation of the adrenal cortex. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes*, 7, 122–127.
- Oleaga, A., & Goñi, F. (2008). Feocromocitoma: actualización diagnóstica y terapéutica. *Endocrinol Nutr.*, 55(5), 202–216.
- Ortega, T. M., Feldman, E. C., Nelson, R. W., Willits, N., & Cowgill, L. D. (1996). Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 209, 1724–1729.
- Pacak, K. (2000). Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol. Res.*, 49, S11-7.
- Page, R. (1994). The anatomy of the hypothalamo-hypophysial complex. In J. In

- Knobil, E., Neill (Ed.), *The Physiology of Reproduction* (pp. 1527–1619). New York: Raven Press.
- Pagotto, R. M. (2012). “Influencia de la histamina en la regulación del desarrollo y el mantenimiento de las funciones de los tejidos esteroideogénicos testicular y córticoadrenal.” Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Panagiotakopoulos, L., & Neigh, G. (2014). of the HPA Axis: Where and When Do Sex Differences Manifest? *Front Neuroendocrin*, 35, 285–302.
- Papadimitriou, A., & Priftis, K. . (2009). of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 265–71.
- Park, F. M., Blois, S. L., Wood, R. D., Allen, D. G., Nykamp, S. G., & Downie, A. (2013). Hypercoagulability and ACTH-Dependent Hyperadrenocorticism in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(5), 1136–1142.
- Pattison, C., Saltzman, W., Abbott, D., Hogan, B., Nguyen, A., Husen, B., ... Bird, I. (2007). Gender and gonadal status differences in zona reticularis expression in marmoset monkey adrenals: Cytochrome b5 localization with respect to cytochrome P450 17,20-lyase activity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 265–266, 93–101.
- Perel, C. (2014). Feocromocitoma. *Insuficiencia Cardíaca*, 9 (3), 120–133.
- Pérez Castro, C., Renner, U., Haedo, M. R., Stalla, G. K., & Arzt, E. (2012). Cellular and Molecular Specificity of Pituitary Gland Physiology. *Physiol. Rev.*, 92, 1–38.
- Petersen, L. J., Petersen, J. R., Talleruphuus, U., Ladefoged, S. D., Mehlsen, J., & Jensen, H. Æ. (1997). The pulsatility index and the resistive index in renal arteries. Associations with long-term progression in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 12, 1376–1380.
- Pio-Abreu, A., & Drager, L. F. (2018). Resistant Hypertension: Time to Consider the Best Fifth Anti-Hypertensive Treatment. *Current Hypertension Reports*, 20(8), 67 (1-4).
- Pivonello, R., Ferone, D., de Herder, W., Kros, J., del Basso de Caro, M., Arvigo, M., ... Lamberts, S. (2004). Dopamine receptor expression and function in corticotroph pituitary tumors. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89, 2452–2462.
- Pivonello, R., Martino, M. C., De Leo, M., Tauchmanová, L., Faggiano, A., Lombardi, G., & Colao, A. (2007). Cushing ' s Syndrome : Aftermath of the Cure. *Endocrinol Metab*, 51(8), 1381–1391.
- Platt, J. F., Ellis, J. H., Rubin, J. M., DiPietro, M. A., & Sedman, A. B. (1990). Intrarenal arterial Doppler sonography in patients with nonobstructive renal disease: correlation of resistive index with biopsy findings. *Am J Radiol*, 154(6), 1223–

- Plotsky, P. M., Cunningham, E. T. J., & Widmaier, E. P. (1989). Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev*, *10*, 437–58.
- Prázný, M., Ježková, J., Horová, E., Lazárová, V., Hána, V., Kvasnička, J., ... Kršek, M. (2008). Impaired microvascular reactivity and endothelial function in patients with Cushing's syndrome: Influence of arterial hypertension. *Physiological Research*, *57*, 13–22.
- Reilly, C. F., Fujita, T., Hutzelmann, J. E., Mayer, E. J., & Shebuski, R. J. (1991). Plasminogen activator inhibitor-1 suppresses endogenous fibrinolysis in a canine model of pulmonary embolism. *Circulation*, *84*(1), 287–292.
- Remaley, A. T. (2007). Old drug, new tricks: The unexpected effect of doxazosin on high-density lipoprotein. *Circulation Research*, *101*(2), 116–118.
- Reusch, C. E., & Feldman, E. C. (1991). Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. *J. Vet. Intern. Med.*, *5*, 3–10.
- Ring, R. (2005). The central vasopressinergic system: examining the opportunities for psychiatric drug development. *Curr. Pharm. Des*, *11*, 205–25.
- Rivier, C., & Vale, W. (1983). Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotropin-releasing factor. *Regul. Peptides.*, *7*, 253–258.
- Rizzoni, D., Porteri, E., De Ciuceis, C., Rodella, L. F., Paiardi, S., Rizzardi, N., ... Rosei, E. A. (2009). Hypertrophic remodeling of subcutaneous small resistance arteries in patients with Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *94*(12), 5010–5018.
- Roble, N. R., Gómez Campderá, F., Ocón, J., Manjón, M., Pastor, L., Herrera, J., ... Tornero, F. (2005). Doxazosina asociada a la combinación bloqueante del eje renina-angiotensina y calcioantagonista en pacientes con insuficiencia renal crónica. *NEFROLOGÍA*, *25*(5), 515–520.
- Rocha, R., Rudolph, A. E., Friedrich, G. E., Nachowiak, D. A., Kekec, B. K., Blomme, E. A. G., ... Delyani, J. A. (2002). Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *283*(5), H1802–H1810.
- Romeo, R. D. (2010). Pubertal maturation and programming of hypothalamic–pituitary–adrenal reactivity. *Front. Neuroendocrinol.*, *31*, 232–240.
- Rosenberg, J. B., Foster, P. A., Kaufman, R. J., Vokac, E. A., Moussalli, M., Kroner, P. A., & Montgomery, R. R. (1998). Intracellular trafficking of factor VIII to von Willebrand factor storage granules. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(3), 613–624.

- Rossi, D. V., Dai, Y., Thomas, P., Carrasco, G. A., DonCarlos, L. L., Muma, N. A., & Li, Q. (2010). Estradiol-induced desensitization of 5-HT_{1A} receptor signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus is independent of estrogen receptor beta. *Psychoneuroendocrinology*, *35*, 1023–1033.
- Sadler, T. W. (2005). Embryology of neural tube development. *Am. J. Med. Genet. C: Semin. Med. Genet.*, *135C*, 2–8.
- Saiardi, A., Bozzi, Y., Baik, J., & Borrelli, E. (1997). Antiproliferative Role of Dopamine: Loss of D₂ Receptors Causes Hormonal Dysfunction and Pituitary Hyperplasia. *Neuron.*, *19*, 115–126.
- Samad, F., & Loskutoff, D. J. (1996). Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *2(5)*, 568–582.
- Samad, F., Pandey, M., Bell, P. A., & Loskutoff, D. J. (2000). Insulin continues to induce plasminogen activator inhibitor 1 gene expression in insulin-resistant mice and adipocytes. *Molecular Medicine*, *6(8)*, 680–692.
- Samandari, E., Kempna, P., Nuoffer, J. M., Hofer, G., Mullis, P. E., & Fluck, C. E. (2007). Human adrenal corticocarcinoma NCI-H295R cells produce more androgens than NCI-H295A cells and differ in 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 17,20 lyase activities. *J. Endocrinol.*, *195*, 459–472.
- Sánchez Trucios, R. A. (2010). Feocromocitoma: Diagnóstico y tratamiento. *Cardiología*, *21(3)*, 124–137.
- Sanders, K., Mol, J. A., Kooistra, H. S., Slob, A., & Galac, S. (2016). New Insights in the Functional Zonation of the Canine Adrenal Cortex. *J Vet. Intern. Med*, *30(3)*, 741–750.
- Sartori, M., Calò, L. A., Mascagna, V., Realdi, A., MacChini, L., Ciccariello, L., ... Semplicini, A. (2006). Aldosterone and refractory hypertension: A prospective cohort study. *American Journal of Hypertension*, *19*, 373–379.
- Sasaki, F., & Nishioka, S. (1998). Fetal development of the pituitary gland in the Beagle, *251*, 143–151.
- Sawchenko, P. E. (1987). Evidence for a local site of action for glucocorticoids in inhibiting CRF and vasopressin expression in the paraventricular nucleus. *Brain. Res.*, *403*, 213–23.
- Scanes, C. G., Jeftinija, S., Glavaski-Joksimovic, A. Proudman, J., Arámburo, C., & Anderson, L. L. (2005). The anterior pituitary gland: lessons from livestock. *Dom. Anim. Endocr.*, *29*, 23–33.
- Schellenberg, S., Mettler, M., Gentilini, F., Portmann, R., Glaus, T. M., & Reusch, C. E. (2008). The effects of hydrocortisone on systemic arterial blood pressure and

- urinary protein excretion in dogs. *J Vet Intern Med*, 22, 273–281.
- Schiffrin, E. L. (2004a). Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *American Journal of Hypertension*, 17(12), 1192–1200.
- Schiffrin, E. L. (2004b). The Many Targets of Aldosterone. *Hypertension*, 43(5), 938–940.
- Schlosser, S. F., Almeida, O. F., Patchev, V. K., Yassouridis, A., & Elands, J. (1994). Oxytocin-stimulated release of adrenocorticotropin from the rat pituitary is mediated by arginine vasopressin receptors of the V1b type. *Endocrinology*, 135(5), 2058–2063.
- Schoemaker, N. J., Kuijten, A. M., & Galac, S. (2008). Luteinizing hormone-dependent Cushing's syndrome in a pet ferret (*Mustela putorius furo*). *Domestic Animal Endocrinology*, 34(3), 278–283.
- Scholz, A. D., Sprague, G. R., & Kernohan, W. J. (1957). Cardiovascular and Renal complications of cushing's syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 256, 833–837.
- Schwartz, C., & Andrews, M. . (2013). Circannual transitions in gene expression: Lessons from seasonal adaptations. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 105, 247–273.
- Shapiro, R. A., Xu, C., & Dorsa, D. M. (2000). Differential transcriptional regulation of rat vasopressin gene expression by estrogen receptor a and b. *Endocrinology*, 141, 4056–4064.
- Shibata, S., & Fujita, T. (2012). Mineralocorticoid receptors in the pathophysiology of chronic kidney diseases and the metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350, 273–280.
- Singhal, R., & Brimble, K. S. (2006). Thromboembolic complications in the nephrotic syndrome: Pathophysiology and clinical management. *Thrombosis Research*, 118(3), 397–407.
- Skurk, T., Lee, Y. M., & Hauner, H. (2001). Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture. *Hypertension*.
- Smajić, J., Hasić, S., & Rašić, S. (2018). High-density lipoprotein cholesterol , apolipoprotein E and atherogenic index of plasma are associated with risk of chronic kidney disease. *Med Glas (Zenica)*, 15, 115–121.
- Small, M., Lowe, G. D., Forbes, C. D., & Thomson, J. A. (1983). Thromboembolic complications in Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol*, 19, 503–511.
- Smets, P. M. Y., Lefebvre, H. P., Kooistra, H. S., Meyer, E., Croubels, S., Maddens, B. E. ., ... Daminet, S. (2012). Hypercortisolism affects glomerular and tubular function in dogs. *The Veterinary Journal*, 192, 532–534.

- Smets, P. M. Y., Lefebvre, H. P., Meij, B. P., Croubels, S., Meyer, E., Van de Maele, I., & Daminet, S. (2012). Long-Term Follow-Up of Renal Function in Dogs after Treatment for ACTH-Dependent Hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med*, *26*, 565–573.
- Smets, P., Meyer, E., Maddens, B., & Daminet, S. (2010). Cushing's syndrome, glucocorticoids and the kidney. *General and Comparative Endocrinology*, *169*, 1–10.
- Soler, E. A., Castillo, V. A., Fernando, C., & Velandia, D. J. (2011). Clinical applications of scintigraphy in small animals in Buenos Aires, Argentina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *24*, 170–178.
- Stocco, D. (2001). StAR Protein and the Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis. *Physiology*, *63*, 193–213.
- Stokol, T., Brooks, M. B., Erb, H. N., & Mauldin, G. E. (2000). D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Veterinary Research*, *61*(4), 393–8.
- Štrauch, B., Petrák, O., Wichterle, D., Zelinka, T., Holaj, R., & Widimský, J. (2006). Increased Arterial Wall Stiffness in Primary Aldosteronism in Comparison With Essential Hypertension. *American Journal of Hypertension*, *19*, 909–914.
- Suh, H., Gage, P. J., Drouin, J., & Camper, S. A. (2002). Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification. *Development*, *129*, 329–337.
- Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., & Egido, J. (2003). Inflammation and angiotensin II. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *35*(6), 881–900.
- Swanson, L. W., & Sawchenko, P. E. (1983). Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.*, *6*, 269–324.
- Szarek, E., Cheah, P. S., Schwartz, J., & Thomas, P. (2010). Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus. *Mol. Cell. Endocrinol.*, *323*, 115–123.
- Tagle, V. R. (2010). Terapia antihipertensiva en Enfermedad renal Crónica. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *21*(4), 541–552.
- Takuma, N., Sheng, H. Z., Furuta, Y., Ward, J. M., Sharma, K., Hogan, B. L., ... Mahon, K. A. (1998). Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development*, *125*, 4835–4840.
- Tanaka, S. (2003). Comparative aspects of intracellular proteolytic processing of peptide hormone precursors: studies of proopiomelanocortin processing. *Zool. Sci.*, *20*, 1183–1198.
- Taniguchi, Y., Yasutaka, S., Kominami, R., & Shinohara, H. (2002). Proliferation and

- differentiation of rat anterior pituitary cells. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 206, 1–11.
- Terrazzino, S., Perego, C., & De Simoni, M. G. (1995). Effect of development of habituation to restraint stress on hypothalamic noradrenaline release and adrenocorticotropin secretion. *J. Neurochem.*, 65, 263–7.
- Teshima, T., Hara, Y., Taoda, T., Koyama, H., Takahashi, K., Nezu, Y., ... Tagawa, M. (2008). Cushing ' s Disease Complicated with Thrombosis in a Dog. *J. Vet. Med. Sci*, 70(5), 487–491.
- Thapar, H., Kovacs, K., Laws, E. R., & Muller, P. J. (1993). Pituitary adenomas: current concepts in classification, histopathology and molecular biology. *The Endocrinologist*, 3, 39–57.
- Theodoropoulou, M., & Stalla, G. K. (2013). Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Front. Neuroendocrin.*, 34, 228–252.
- Touyz, R. M., Tabet, F., & Schiffrin, E. L. (2003). Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30(11), 860–866.
- Treier, M., Gleiberman, A. S., O'Connell, S. M., Szeto, D. P., McMahon, J. A., McMahon, A. P., & Rosenfeld, M. G. (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.*, 12, 1691–1704.
- Trementino, L., Arnaldi, G., Appolloni, G., Daidone, V., Scaroni, C., Casonato, A., & Boscaro, M. (2010). Coagulopathy in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*, 92(SUPPL. 1), 55–59.
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.*, 53, 865–71.
- Ulick, S., Wang, Z. J., Blumenfeld, D. J., & Pickering, G. T. (1992). Cortisol inactivation overload: A mechanism of mineralocorticoid hypertension in the Ectopic Adrenocorticotropin Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 74, 963–967.
- Vahouny, G. V., Chanderbhan, R., Stewart, P., Tombes, R., Keyeyune-Nyombi, E., Fiskum, G., & Scallen, T. J. (1985). Phospholipids, sterol carrier protein² and adrenal steroidogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 834, 324–330.
- Van der Pas, R., de Bruin, C., Leebeek, F. W. G., de Maat, M. P. M., Rijken, D. C., Pereira, A. M., ... Feelders, R. A. (2012). The hypercoagulable state in Cushing's disease is associated with increased levels of procoagulant factors and impaired fibrinolysis, but is not reversible after short-term biochemical remission induced by medical therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(4), 1303–10.
- Van Der Pas, R., Leebeek, F. W. G., Hofland, L. J., De Herder, W. W., & Feelders, R. A. (2013). Hypercoagulability in Cushing ' s syndrome : prevalence , pathogenesis

- and treatment. *Clin Endocrinol*, 78, 481–488.
- Van der Pas, R., Van Esch, J. H. M., de Bruin, C., Danser, A. H. J., Pereira, A. M., Zelissen, P. M., ... Feelders, R. A. (2014). Cushing's disease and hypertension: in vivo and in vitro study of the role of the renin-angiotensin-aldosterone system and effects of medical therapy. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 170(2), 181–91.
- Van der Vlugt-Meijer, R. H., Voorhout, G., & Meij, B. P. (2002). Imaging of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197, 81–87.
- Vaziri, N. D., Paule, P., Toohey, J., Hung, E., Alikhani, S., Darwish, R., & Pahl, M. V. (1984). Acquired Deficiency and Urinary Excretion of Antithrombin III in Nephrotic Syndrome. *Archives of Internal Medicine*, 144(9), 1802–1803.
- Vegiopoulos, A., & Herzig, S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 43–61.
- Vidal, P., Miceli, D., & Castillo, V. (2016). Estudio de diferentes factores de coagulación que determinan el estado de hipercoagulabilidad en el perro con Enfermedad de Cushing. *InVet*, 18(1), 217.
- Vidal, P. N., Miceli, D. D., Arias, E. S., Anna, E. D., García, J. D., & Castillo, V. A. (2018). Decrease of nitric oxide and increase in diastolic blood pressure are two events that affect renal function in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 86–95.
- Watanabe, T., Barker, T. A., & Berk, B. C. (2005). Angiotensin II and the endothelium: Diverse signals and effects. *Hypertension*, 45(2), 163–169.
- Wehner, A., Hartmann, K., & Hirschberger, J. (2008). Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases. *Veterinary Record*, 162, 141–147.
- Wen, C., Li, M., & Whitworth, J. A. (2000). Role of Nitric Oxide in Adrenocorticotrophin-Induced Hypertension: L -Arginine Effects Reversed By N -Nitro- L -Arginine. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27, 887–890.
- Witek, P., Witek, J., Zieliński, G., Podgajny, Z., & Kamiński, G. (2015). Ectopic Cushing's syndrome in light of modern diagnostic techniques and treatment options. *Neuro. Endocrinol. Lett.*, 36(3), 201–8.
- Wittkowski, W., Bockmann, J., Kreutz, M. R., & Bockers, T. M. (1999). Cell and Molecular Biology of the Pars Tuberalis of the Pituitary. *International Review of Cytology*, 185, 157–194.
- Wood, C. E., Shinsako, J., & Dallman, M. F. (1982). Comparison of canine corticosterone responses to mean and phasic increases in ACTH. *Am. J. Physiol.*,

242, E102–E108.

- Wood, C. E., Shinsako, J., Keil, L. C., Ramsay, D. J., & Dallman, M. F. (1982). Apparent dissociation of adrenocorticotropin and corticosteroid responses to 15 ml/kg hemorrhage in conscious dogs. *Endocrinology*, *110*, 1416–1421.
- Xiong, F., & Zhang, L. (2013). Role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Developmental Programming of Health and Disease. *Front. Neuroendocrinol*, *34*(1), 27–46.
- Xue, C., & Siragy, H. M. (2005). Local renal aldosterone system and its regulation by salt, diabetes, and angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension*, *46*(3), 584–590.
- Yamada, H., Sexton, P. ., Chai, S. Y., Adam, W. R., & Mendelsohn, F. A. O. (1990). Angiotensin II receptors in the kidney. Localization and Physiological Significance. *Kidney and Blood Pressure Research*, *3*(3), 250–255.
- Yanagawa, N., Capparelli, A. W., Jo, O. D., Friedal, A., Barrett, J. D., & Eggena, P. (1991). Production of angotensinogen and renin-like activity by rabbit proximal tubular cells in culture. *Kidney International*, *39*, 938–941.
- Yang, S., & Zhang, L. (2004). Glucocorticoids and Vascular Reactivity. *Current Vascular Pharmacology*, *2*(1), 1–12.
- Yeung, C., Chan, C., Leung, P., & Cheng, C. H. . (2006). Cells in focus Cells of the anterior pituitary. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, *38*, 1441–1449.
- Young, L. S., Murphy, G., Kelly, S. N., Smith, T. P., Cunningham, S. K., & McKenna, J. T. (2003). Differential production of adrenal steroids by purified cells of the human adrenal cortex is relative rather than absolute. *Eur. J. Endocrinol.*, *148*, 139–45.
- Zhang, Y., Damjanoska, K. J., Carrasco, G. A., Dudas, B., D'Souza, D. N., Tetzlaff, J., ... Van de Kar, L. D. (2002). Evidence that 5-HT_{2A} receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate neuroendocrine responses to (-) DOI. *J. Neurosci.*, *22*, 9635–9642.
- Zhu, X., Gleiberman, A. S., & Rosenfeld, M. G. (2007). Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol. Rev.*, *87*, 933–963.
- Zini, E., Bonfanti, U., & Zatelli, A. (2004). Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. *Am J Vet Res*, *65*, 964–971.

ANEXO

12. ANEXO - “Trabajos y publicaciones que se desprenden de esta Tesis y grupo de trabajo”

13.1. Trabajos que se desprenden directamente de la Tesis:

- **“DECREASE OF NITRIC OXIDE AND INCREASE IN DIASTOLIC BLOOD PRESSURE ARE TWO EVENTS THAT AFFECT RENAL FUNCTION IN DOGS WITH PITUITARY DEPENDENT HYPERADRENOCORTICISM”.**

Patricia N. Vidal, Diego D. Miceli, Elber Soler Arias, Elena D'Anna, Jorge D. García and Víctor Alejandro Castillo. Open Veterinary Journal, (2018), Vol. 8(1): 86-95
ISSN: 2226-4485 (Print) Original Article ISSN: 2218-6050 (Online)
Original Article DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ovj.v8i1.14>

- **“CENTELLOGRAFIA DE PERFUSION PULMONAR COMO METODO DE DETECCION PRECOZ DE TROMBOEMBOLISMO PULMONAR EN PERROS CON ENFERMEDAD DE CUSHIN”.**

Vidal Patricia N; Castillo Víctor A. InVet - ISSN/ISBN: 1668-3498
<http://www.fvet.uba.ar/?q=jornadas#2018>

- **“HYPERCOAGULABLE STATE AND RISK OF TROMBOSIS IN THE DOG WITH CUSHING’S DISEASE”**

Patricia Noemí Vidal, Diego Daniel Miceli, Víctor Alejandro Castillo
MEDICINA - Volumen 77 - (Supl. I), 2017. Pág. 178. (ISSN/ISBN: 1669-9106)

- **“TASA DE FILTRADO GLOMERULAR Y TIEMPO DE REACTIVIDAD, DOS VARIABLES AFECTADAS EN EL PERROS CON SÍNDROME DE CUSHING.”**

VIDAL P; MICELI D; CASTILLO V. InVet - ISSN/ISBN: 1668-3498
<http://www.fvet.uba.ar/archivos/publicaciones/invet/vol19-2-2017/Libro-de-resumenes.pdf>

- **“ESTUDIO DE DIFERENTES FACTORES DE COAGULACIÓN QUE DETERMINAN EL ESTADO DE HIPERCOAGULABILIDAD EN EL PERRO CON ENFERMEDAD DE CUSHING.”**

VIDAL P; MICELI D; CASTILLO V. InVet - ISSN/ISBN: 1668-3498
<http://www.fvet.uba.ar/fcvanterior/publicaciones/archivos/vol18-1-2016/VI%20Jornadas-Jovenes-Investigadores-2016.pdf>

- “ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE ANTITROMBINA-III Y DEL DÍMERO D COMO MARCADORES DE RIESGO Y FORMACIÓN DE TROMBOS EN EL PERRO CON ENFERMEDAD DE CUSHING”.

Vidal, P; Miceli, D; Micciullo, V; Pereyra, M; D'Anna, E; Cabrera Blatter, MF; Gallelli, MF; Gómez, N; García, J; Martiarena, B; Castillo, V. Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo ISSN/ISBN: 0326-4610

<http://www.raem.org.ar/numeros/2015-vol52/suplemento/tor043.pdf>

- “FACTOR DE VON WILLEBRAND, PAI-1 Y ÓXIDO NÍTRICO EN EL PERRO CON ENFERMEDAD DE CUSHING”.

Vidal, P; Miceli, D; Micciullo, V; Pereyra, M; Cabrera Blatter, MF; Gallelli, MF; Gómez, N; Martiarena, B; Castillo, V. Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo ISSN/ISBN: 0326-4610

<http://www.raem.org.ar/numeros/2015-vol52/suplemento/tor044.pdf>

- “NEFROPATÍA ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DE CUSHING EN EL PERRO: ESTUDIO DE VARIABLES DE VALOR PREDICTIVO DE DAÑO RENAL”.

Vidal Patricia N; Castillo Víctor A. InVet - ISSN/ISBN: 1668-3498

<http://www.fvet.uba.ar/fcvanterior/publicaciones/archivos/Libro-de-resumenes.pdf>

13.2. Participación en otros trabajos durante el desarrollo de la tesis con el grupo de trabajo:

- “METFORMIN REDUCES INSULIN RESISTANCE AND THE TENDENCY TOWARD HYPERGLYCAEMIA AND DYSLIPIDAEMIA IN DOGS WITH HYPERADRENOCORTICISM”.

Diego Daniel Miceli, Patricia Noemí Vidal, María Fernanda Cabrera Batter, Omar Pignataro and Victor Alejandro Castillo. Open Veterinary Journal, (2018), Vol. 8(2): 193-199 ISSN: 2226-4485 (Print) ISSN: 2218-6050 (Online) Original Article DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ovj.v8i2.13>

- “OVEREXPRESSION OF 11B-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE 1 IN VISCERAL ADIPOSE TISSUE AND UNDEREXPRESSION OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE IN THE ADRENAL CORTEX OF DOGS WITH HYPERADRENOCORTICISM”.

Diego Daniel Miceli, Adriana María Belén Abiuso, Patricia Noemí Vidal, María Florencia Gallelli, Omar Pedro Pignataro and Victor Alejandro Castillo. Open Veterinary Journal, (2018), Vol. 8(1): 77-85 ISSN: 2226-4485 (Print) ISSN: 2218-6050 (Online)

Original Article DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ovj.v8i1.13>

- “POST-SURGICAL TREATMENT OF THYROID CARCINOMA IN DOGS WITH RETINOIC ACID 9 CIS IMPROVES PATIENT OUTCOME”.

V. Castillo, P. Pessina, P. Hall, M.F. Cabrera Blatter, D. Miceli, E. Soler Arias and P. Vidal.
Open Veterinary Journal, (2016), Vol. 6(1): 6-14 ISSN: 2226-4485 (Print) ISSN: 2218-6050
(Online)

- “DIABETES MELLITUS REMISIÓN IN THREE CATS WITH ACROMEGALY AFTER CABERGOLINE TREATMENT”

Miceli DD, Soler Arias EA, Vidal PN, Castillo VA. Summer School of Veterinary Endocrinology 2018, ESVE. Bologna, Italy. 2018. Póster

- “CONCURRENCIA DE SINDROME DE CUSHING Y DIABETES MELLITUS EN PERROS.”

MICELI DD; VIDAL PN; PIGNATARO OP; CASTILLO V. InVet - ISSN/ISBN: 1668-3498
<http://www.fvet.uba.ar/fcvanterior/publicaciones/archivos/vol18-1-2016/VI%20Jornadas-Jovenes-Investigadores-2016.pdf>

- “FENOFIBRATO EN EL TRATAMIENTO DE LAS DISLIPEMIAS DEBIDO A HIPERTRIGLICERIDEMIA PURA O MIXTAS”.

CASTILLO, Víctor; MICELI, Diego; CABRERA BLATTER, María F; VIDAL, Patricia; BRAÑAS; Mercedes; BREGANTE, Marina; SOLER ARIAS, Elber.
9NAS. JORNADAS INTERNACIONALES DE VETERINARIA PRÁCTICA.
Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires - Mar del Plata, Hotel Sheraton. 2015.
Póster.

- “LA METFORMINA REDUCE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA, TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL TOTAL EN EL PERRO CON CUSHING”.

MICELI, Diego; VIDAL, Patricia; CABRERA BLATTER, María F; BRAÑAS; Mercedes; BREGANTE, Marina; CASTILLO, Víctor.
9NAS. JORNADAS INTERNACIONALES DE VETERINARIA PRÁCTICA.
Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires - Mar del Plata, Hotel Sheraton. 2015.
Póster.

- “RAZAS DE PERROS CON EXPRESIÓN OLIGOSINTOMÁTICAS EN ENFERMEDAD DE CUSHING”.

Vidal Patricia N; Castillo Víctor A. IV JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES EN CIENCIAS VETERINARIAS 2014.