

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Avaliação do efeito da associação entre selegilina e trilostano no tratamento do hiperadrenocorticismismo canino pituitário-dependente: ensaio clínico randomizado**

**Guilherme Luiz Carvalho de Carvalho**

**Porto Alegre**

**2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Avaliação do efeito da associação entre selegilina e trilostano no tratamento do hiperadrenocorticismismo canino pituitário-dependente: ensaio clínico randomizado**

**Autor: Guilherme Luiz Carvalho de Carvalho**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS, como requisito parcial da obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias**

**Orientador: Prof. Dr. Alan Gomes Pöpl**

**Porto Alegre**

**2018**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

#### CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Guilherme Luiz Carvalho de  
Avaliação da associação entre selegilina e trilostano no tratamento do hiperadrenocorticismismo pituitário-dependente canino: ensaio clínico randomizado / Guilherme Luiz Carvalho de Carvalho. -- 2018.  
68 f.  
Orientador: Alan Gomes Pöpl.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Hiperadrenocorticismismo. 2. Síndrome de Cushing. 3. Hiperadrenocorticismismo. 4. Hipófise. 5. ACTH. I. Pöpl, Alan Gomes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Guilherme Luiz Carvalho de Carvalho

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SELEGILINA E TRILOSTANO NO TRATAMENTO DO HIPERADRENOCORTICISMO CANINO PITUITÁRIO-DEPENDENTE: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Aprovado em 29 MAR 2018

APROVADO POR

---

Prof. Dr. Alan Gomes Pöpl  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Marcelo de Lacerda Grillo  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Cristiano Gomes  
Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Stella de Faria Valle  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Tão difícil como a concepção deste trabalho é agradecer sem esquecer ou desmerecer. Esta obra só pôde ser concluída por contar com os sonhos, dedicação e entusiasmo de muitas cabeças, mãos e corações. São tempos difíceis os de hoje, e o conhecimento parece cada vez mais companheiro da tolerância, dos direitos humanos e da cultura em um calabouço escuro...

Este trabalho foi realizado com a fibra de mulheres, pois sem Luana, Carolina e Letícia esta página não seria escrita bem como as demais. Vocês, *gurias*, foram o meu esteio e o meu incentivo para seguir com esse sonho (e desafio, que deu muito medo) com a esperança de que ao fim tudo ficaria bem.

À minha família, e aqui mais uma guerreira vale o mérito. Obrigado Valéria, mãezinha, por permitir meu acesso ao maravilhoso mundo da leitura, do belo, do humano e do significado do amor. A garra em tempos de crise não me é exclusiva ou inédita, aparentemente. Obrigado meu pai, Jorge, pelos exemplos e pelos aprendizados.

À minha companheira, Luana, que com o perfeito equilíbrio entre a amizade e o afeto conseguiu amenizar nos momentos mais difíceis todas as incertezas, as dores e me permitiu crescer. Aprendemos a crescer, juntos, e assim nos tornamos uma família. Eu preciso expressar toda gratidão pelo amor e parceria.

Ao parceiro desde o primeiro dia de trote, Waldemir, por toda força e solicitude em resolver o tão esfíngico mundo da estatística e análise de dados. Obrigado, amigo, por me fazer enxergar a filosofia por trás de cada número. Ao iluminado comparsa de jornada Sávio que dividiu comigo muitas risadas, parceria e conhecimento científico e de vida.

Por família se compreende também agradecer à mãe UFRGS por todo seu acolhimento, em tudo que representa como funcionários, colaboradores, pesquisadores e principalmente aos Professores. Nos já referidos tempos difíceis, é motivo de espanto como cada vez menos se

reconhece a mais bela e nobre das profissões a meu ver. Vocês fazem a Universidade acontecer e despertam o melhor em cada um de nós, alunos.

Ainda na UFRGS situo o Hospital de Clínicas Veterinárias, o ‘*agacevê*’, que é onde se sentem em casa os abençoados com a chance de ali estar, aprender e deixar um pouco de si. Uma família especial e sempre disposta a estender a mão, um lugar quase mágico. Lá tive a honra de conviver e contar com o apoio de pessoas fantásticas e extremamente competentes.

Aos ‘complementares’, fundamentais, que possibilitaram todos os exames e parceria: obrigado LACVet nas figuras dos Professores Stella Valle e Félix González; PROVET via Doutores Priscila Viau e Rogério Soila; e setor de diagnóstico por imagem representados pelos Doutores Fabíola Teixeira e Fábio Teixeira por toda competência, precisão e disponibilidade em juntos construirmos o conhecimento que nos fomenta. Obrigado à todas equipes que compõe estas entidades.

A todos os tutores que não mediram esforços em torcer, incentivar e almejar junto essa conquista e a mim confiaram a responsabilidade e a honra de zelar pelo corpo e alma de seus companheiros caninos.

Dedico especial destaque àquele que é o grande responsável por isto tudo. Ao meu imensurável e incansável amigo, camarada, cúmplice, exemplo, colega de banda, de vida, eterno Professor e – na melhor definição – Orientador (assim, com ‘O’ maiúsculo), Alan. Em um disco do Milton Nascimento intitulado ‘*Txai*’, vejo bela síntese do que me ocorre: palavra indígena utilizada no Acre como tratamento de respeito e carinho. ‘Mais que amigo, mais que irmão. A metade de mim que está em você e a metade de você que está em mim’. É... Eu realmente não teria conseguido chegar aqui se não fosse por ele. Disponível em todos os momentos e para ajudar em tudo que foi e é preciso, sempre. Por estes quase dez anos orientando meu caminho, o meu mais profundo e eterno agradecimento.

À Força maior que permeia o Universo e vive dentro de cada um de nós, ‘humanos’ ou não, que apesar de diversos nomes possui comum significado: *Vida*.

## RESUMO

O hiperadrenocorticismo pituitário-dependente canino (HPD) é um distúrbio endócrino comum. Seu manejo clínico geralmente requer terapia com trilostano de uso contínuo, o que pode causar elevação do ACTH endógeno (ACTHe) e adrenomegalia, além de necessidade de recorrentes reajustes de dose. A terapia com selegilina foi previamente indicada para o tratamento da HPD canina a nível hipofisário. Não há estudos associando trilostano e selegilina para o tratamento de HPD em cães. O objetivo do presente estudo foi avaliar resultados clínicos, clínico-patológicos, imagísticos e hormonais em cães com HPD tratados com trilostano (Tri) ou com trilostano e selegilina (Tri + Sel). Quinze cães com diagnóstico de HPD espontâneo foram avaliados: Oito foram tratados com trilostano (Tri) e sete foram tratados com Tri + Sel. Para tal, foi realizado um ensaio clínico randomizado. Os cães foram submetidos a exame clínico, e análises de hemograma, bioquímica sérica, urinálise e ultrassonografia abdominal, além de determinação das concentrações de ACTH endógeno e cortisol pós-ACTH nos dias zero (D0), 30 (D30), 90 (D90) e 180 (D180) de tratamento. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na variação endógena de ACTHe no grupo Tri (mediana D0 = 20,85 pg/dL; mediana D180 = 79,0 pg/dL;  $p = 0,07$ ) e grupo Tri + Sel (mediana D0 = 103 pg/dL, mediana D180 = 98,25 pg/dL,  $p = 0,57$ ). Ambos os grupos apresentaram níveis de cortisol pós-ACTH significativamente menores no final do estudo (Tri mediana D0 = 15  $\mu\text{g/dL}$ ; D180 = 5,2  $\mu\text{g/dL}$ ;  $p = 0,002$  versus Tri + Sel mediana D0 = 17,23  $\mu\text{g/dL}$ ; D180 = 2,26  $\mu\text{g/dL}$ ;  $p = 0,006$ ). Além disso, ambos os grupos necessitaram de ajustes de dosagem de trilostano ( $p = 0,01$ ). No entanto, nenhuma diferença estatística foi observada neste quesito entre os grupos ao final do estudo. Houve menor variação na espessura das adrenais do grupo Tri + Sel (adrenal esquerda D0 = 0,65 cm; mediana D180 = 0,71;  $p = 0,7$ ) quando comparada ao grupo Tri (mediana da adrenal esquerda D0 = 0,77 cm; mediana D180 = 0,97 cm;  $p = 0,09$ ). O mesmo foi observado para a espessura da glândula adrenal direita (Tri + Sel mediana D0 = 0,65 cm; mediana D180 = 0,58 cm;  $p = 0,2$  versus Tri mediana D0 = 0,58 cm; mediana D180 = 0,77 cm;  $p = 0,04$ ). Além disso, os pacientes do grupo Tri + Sel parecem ter alcançado melhor controle metabólico ao longo da avaliação se observados os valores de fructosamina e colesterol total. Não obstante, nenhuma diferença no controle clínico ou no estado da função cognitiva foi percebida entre os grupos. A associação entre trilostano e selegilina parece uma terapia complementar segura e promissora para o HPD canino. No entanto, mais estudos são necessários avaliando um maior número de pacientes para esclarecer o real efeito dessa associação, assim como maior tempo de seguimento.

**Palavras-chave:** Hiperadrenocorticismo. ACTH. Inibidor MAO. Terapia pituitária.

## ABSTRACT

*Canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH) is a common endocrine disorder. Clinical management usually demands lifelong trilostane therapy, which may cause endogenous ACTH (eACTH) elevation, adrenomegaly, and recurrent dose adjustments requirements. Selegiline therapy have been prior indicated for canine PDH treatment at pituitary level. There are no studies associating trilostane and selegiline for PDH treatment in dogs. The objective of this study was evaluate clinical, clinical-pathological, imagistic, and hormonal results in dogs with PDH treated with trilostane (Tri) or with trilostane and selegiline (Tri+Sel). Fifteen client-owned dogs diagnosed with spontaneous PDH were evaluated: eight were treated with trilostane (Tri) and seven were treated with trilostane and selegiline (Tri+Sel) in a randomized clinical trial. Dogs underwent clinical examination, serum biochemical analysis, urine analysis, abdominal ultrasound, endogenous ACTH, and post-ACTH cortisol concentrations on days zero (D0), 30 (D30), 90 (D90) and 180 (D180) of treatment. There was no significant difference at 95% confidence level on endogenous ACTH variation between group Tri (median D0 = 20.85 pg/dL; median D180 = 79.0 pg/dL;  $p = 0.07$ ) and group Tri+Sel (median D0 = 103 pg/dL; median D180 = 98.25;  $p = 0.57$ ). Both groups showed significant lower post-ACTH cortisol levels at the end of study (Tri median D0 = 15  $\mu\text{g/dL}$ ; D180 = 5.2  $\mu\text{g/dL}$ ;  $p = 0,002$  versus Tri+Sel median D0 = 17.23  $\mu\text{g/dL}$ ; D180 = 2.26  $\mu\text{g/dL}$ ;  $p = 0.006$ ). Also, both groups needed trilostane dosage adjustments ( $p = 0,01$ ). However, no statistical difference was observed between the groups at the end of the study. Nonetheless, there was minor variation on left adrenal glands thickness of group Tri+Sel (left adrenal median D0 = 0.65 cm; median D180 = 0.71;  $p = 0.7$ ) when compared with group Tri (left adrenal median D0 = 0.77 cm; median D180 = 0.97 cm;  $p = 0.09$ ). The same was observed for right adrenal glands thickness (Tri+Sel median D0 = 0.65 cm; median D180 = 0.58 cm;  $p = 0.2$  versus Tri median D0 = 0.58 cm; median D180 = 0.77 cm;  $p = 0.04$ ). Moreover, patients in group Tri+Sel seemed to have achieved better metabolic control throughout fructosamine and total cholesterol evaluation. Notwithstanding, no differences on clinical control or cognitive function status was perceived between groups. The association between trilostane and selegiline seems a safe and promising complementary therapy for canine HPD. However, further studies are need with larger patient number to clarify the real effect of this association, as well as longer follow up.*

**Keywords:** *Hypercortisolism. ACTH. MAO inhibitor. Pituitary-targeted therapy.*



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Percentual

< - Menor

> - Maior

µg - Micrograma

3β-HSD - 3 β-hidroxiesteroide-desidrogenase

11β-HSD - 11 β-hidroxiesteroide-desidrogenase

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ACTHe – ACTH endógeno

ADH – Hormônio antidiurético

ALT – Alanina-aminotransferase

BID – A cada 12h

CBX – Carbenoxolone

CD – *Cushing's disease*

CS – *Cushing's syndrome*

CRH – Hormônio liberador da corticotrofina

D2 – Receptor dopaminérgico tipo-2

dL - Decilitro

FA – Fosfatase alcalina

FSH – Hormônio folículo-estimulante

GH – Hormônio do crescimento

h - Hora

HAC - Hiperadrenocorticismo

HPD – Hiperadrenocorticismo pituitário-dependente

kg - Kilograma

MAO-B – Monoaminoxidase – beta

mg – Miligrama

*p* – Probabilidade de significância

pg - Picograma

PPAR-γ – Ligante do receptor ativado por proliferador do peroxissoma gama

PRL - Prolactina

Pu/Pd – Poliúria/polidipsia

RC:CU – Relação cortisol:creatinina urinária

RM – Ressonância magnética

SC – Síndrome de Cushing

SDCC – Síndrome da disfunção cognitiva canina

Sel - Selegilina

SID - A cada 24h

TAF – Tumor adrenocortical funcional

TC – Tomografia computadorizada

TeACTH – Teste de estímulo por ACTH

Tri - Trilostano

TSBDD – Teste de supressão por baixa dose de dexametasona

TSH – Hormônio estimulador da tireoide

VO – Via oral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Etiopatogenia .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Manifestações Clínico-Laboratoriais.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Testes Diagnósticos Hormonais.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>Terapêutica .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>PROBLEMAS DA PESQUISA .....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1</b>	<b>Delineamento experimental .....</b>	<b>25</b>
<b>6.2</b>	<b>Local de Realização .....</b>	<b>25</b>
<b>6.3</b>	<b>Animais .....</b>	<b>25</b>
<b>6.4</b>	<b>Procedimentos Experimentais .....</b>	<b>26</b>
<b>6.5</b>	<b>Testes de Estimulação por ACTH e Mensuração de Cortisol .....</b>	<b>27</b>
<b>6.6</b>	<b>Mensuração de ACTH Endógeno (ACTHe) .....</b>	<b>27</b>
<b>6.7</b>	<b>Avaliação dos sinais clínicos .....</b>	<b>27</b>
<b>6.8</b>	<b>Avaliação da Função Cognitiva.....</b>	<b>27</b>
<b>6.9</b>	<b>Cálculo Amostral e Análise estatística.....</b>	<b>28</b>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO 1 - Termo de consentimento informado .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente o quadro clínico denominado de uma maneira generalista como Síndrome de Cushing (SC), ou hiperadrenocorticismo (HAC) tem se mostrado frequente em rotinas de atendimento clínico geral e especializado em endocrinologia de cães (PÖPPL *et al*, 2016). Boa parte dessa elevada incidência reflete os avanços em diagnóstico, associados a um aumento expressivo na expectativa de vida dos pacientes, justificando empenho na promoção de melhorias no manejo terapêutico da doença. Via de regra, o hiperadrenocorticismo pituitário-dependente (HPD) é hoje a etiologia mais frequente associada a esse quadro (BEHREND *et al*, 2012), e o sucesso terapêutico atual baseia-se no bom controle dos sinais clínicos associado à melhora nos achados de exames físico e laboratoriais. Com frequência nesses pacientes são encontradas alterações comportamentais compatíveis com a síndrome da disfunção cognitiva canina (SDCC), conforme demonstrado por Silva *et al*. (2017). Contudo, há carência de estudos quanto a sua real incidência em cães com HPD.

Frente à incapacidade de acesso ao tratamento considerado padrão-ouro para adenomas de pituitária (hipofisectomia), opções medicamentosas como o uso do trilostano apresentam-se com alternativas efetivas e seguras para o tratamento da doença (RAMSEY, 2010; BEHREND *et al*, 2013). Sua ação, via mecanismos distintos, é a promoção da redução da biossíntese de cortisol nas adrenais, trazendo como consequências a médio-longo prazo o estímulo a uma elevação da produção do hormônio adrenocorticotrófico endógeno (ACTHe) (SIEBER-RUCKSTUHL *et al*, 2006; TESHIMA *et al*, 2009; GALAC *et al*, 2010). Nos pacientes tratados com trilostano, observa-se aumentos nos níveis de ACTHe e adrenomegalia como consequência do tratamento (MANTIS *et al*, 2003; REUSCH *et al*, 2007; RUCKSTUHL *et al*, 2012).

A selegilina tem sido empregada com sucesso no manejo da SDCC tendo sido reportada baixa taxa de efeitos colaterais e como sendo de fácil acesso no mercado (MILGRAM *et al*, 1995; RUEHL *et al*, 1997; RUEHL *et al*, 1998; MILLS & LEDGER, 2001). Seu mecanismo de ação, que em última instância promove aumento da oferta de dopamina no sistema nervoso central, tornou promissor seu uso para o tratamento médico do HPD não complicado. Contudo, os resultados não incentivaram seu estabelecimento como monoterapia (BRUYETTE *et al*, 1997; PETERSON, 1999; REUSCH *et al*, 1999; BRADDOCK *et al*, 2004)

Não há estudos até o presente momento avaliando tratamento do HPD baseado na associação entre a selegilina e o trilostano, porém a base teórica permite a hipótese de que este

protocolo possa ser eficaz e seguro na premissa de: reduzir os níveis de cortisol e evitar a elevação de ACTHe de maneira segura; requerer doses menores de trilostano para o bom controle do quadro, reduzindo os efeitos já conhecidos de seu emprego como monoterapia; e promover uma melhora nos sinais clínicos da SDCC na população acometida.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O hiperadrenocorticismo (HAC), também denominado síndrome de Cushing (SC) é considerado uma miscelânea de achados clínico-patológicos decorrentes da exposição crônica aos efeitos do hipercortisolismo no organismo. O HAC é uma endocrinopatia frequente no cão, sendo sua incidência crescente em rotinas de atendimento geral e especializado. Em um estudo retrospectivo realizado por Pöppl *et al* (2016) no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul referente a um período de dez anos (2004-2014), esta foi a doença endócrina mais frequente (37%) dos cães atendidos.

### 2.1 Etiopatogenia

Sua origem em cerca de 80-85% dos casos é uma neoplasia hipofisária, HAC Pituitário-Dependente (HPD), responsável por uma elevação supra fisiológica na secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), enquanto 15-20% dos animais possui um tumor primário em uma ou ambas as glândulas adrenais (BEHREND, 2015). Na rotina de pacientes atendidos no HCV-UFRGS, observou-se similar distribuição de casos pituitários dependentes e primários (MARÇAL *et al*, 2017; MARTINS *et al*, 2017).

É válido ressaltar que a hipófise do cão é dividida em porção anterior (*pars distalis*), porção posterior (*pars nervosa*) e uma terceira porção localizada entre ambas, denominada *pars intermedia*. A primeira é a sua porção glandular, sendo a responsável pela produção de ACTH em maior escala frente a um estímulo hipotalâmico. Sua produção é aumentada em resposta a: maior liberação de hormônio liberador da corticotrofina (CRH) hipotalâmico em situações como *stress*, frio ou calor extremo, choque traumático, fome ou hipoglicemia; ou diminuída via *feedback* negativo exercido por altas concentrações de cortisol produzido pelas adrenais. A *pars distalis* é a responsável ainda pela produção de inúmeros outros hormônios pituitários como o hormônio do crescimento (GH), hormônio estimulador da tireoide (TSH), hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e Prolactina (PRL). A *pars nervosa* constitui o tecido envolvido na biossíntese dos hormônios peptídicos oxitocina e vasopressina (ADH). A *pars intermedia* parece ter especial importância na etiologia do HPD por apresentar em seu estroma corticotrofos que respondem a um controle inibitório hipotalâmico via tônus dopaminérgico (ENGELKING, 2010;

BEHREND, 2015). Em alguns pacientes com origem hipofisária para SC, não são detectadas neoplasias corticotróficas, podendo nestes casos haver desregulação da liberação de ACTH por distintos mecanismos, como por exemplo, redução do tônus dopaminérgico secundário ao envelhecimento (BRUYETTE, 1995).

A grande maioria dos casos de HPD responde por um microadenoma (neoformação menor que 10 mm de diâmetro), porém em alguns casos esta medida tem maiores proporções, sendo assim classificados os tumores como macroadenomas (maiores que 10 mm de diâmetro), os quais frequentemente apresentam projeções extra-selares na sela túrcica. Quando restritos à sela túrcica há baixa incidência de sinais neurológicos como alteração de comportamento, cegueira, anorexia, depressão do estado mental e convulsões (GALAC, 2010; BEHREND, 2015)

Existem ainda outras formas menos comuns da doença como sua forma iatrogênica (via administração exógena de glicocorticoides), hiperadrenocorticismos atípicos (quando há manifestações clínico-laboratoriais e de imagem compatíveis com a doença, mas o paciente é negativo nos testes endócrinos, porém apresenta elevações de precursores esteroidais após estímulo por ACTH), e menos frequentemente devido à produção ectópica de ACTH, hiperadrenocorticismos alimentares e aumento no tônus hipotalâmico via superprodução do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) (GALAC, 2010; HERRTAGE & RAMSEY, 2012; BEHREND & MELIÁN, 2013; BEHREND, 2015).

## **2.2 Manifestações Clínico-Laboratoriais**

Os principais sinais clínicos associados a SC são ganho de peso, polifagia, poliúria, polidipsia, dispneia e fraqueza muscular. Por ser um hormônio de efeito multissistêmico, podem ser observadas ainda alterações como distensão abdominal, hepatomegalia, intolerância ao exercício, alopecias, discromias, telangiectasia, comedos, atrofia cutânea e predisposição a piodermites de repetição. O HAC pode predispor ao aparecimento de complicações como hipertensão arterial sistêmica, tromboembolismos e *diabetes mellitus* (GALAC, 2010; HERRTAGE & RAMSEY, 2012; BEHREND & MELIÁN, 2013; BEHREND, 2015, MICIELI *et al*, 2017).

Existe uma série de alterações na patologia clínica de pacientes com hipercortisolismo, sendo as mais frequentes aumento na atividade das enzimas fosfatase alcalina (principal achado bioquímico) e alanina aminotransferase, dislipidemia, hiperglicemia, eritrocitose, trombocitose e

linfopenia. A urinálise demonstra com certa frequência indícios de infecção de trato urinário, variações na densidade urinária de hipo a hiperestenúria e marcante proteinúria em alguns casos (GALAC, 2010; GILOR & GRAVES, 2011; HERRTAGE & RAMSEY, 2012; BEHREND & MELIÁN, 2013; CAVALCANTE *et al.*, 2013; BEHREND, 2015).

O diagnóstico por imagem é uma ferramenta útil para ajudar a caracterizar a origem do quadro via avaliação ultrassonográfica das glândulas adrenais, podendo sugerir origem hipofisária quando houver hiperplasia bilateral ou ainda sugerir neoformações adrenocorticais (tumores adrenocorticais funcionais – TAF) de acordo com o aspecto das glândulas durante o exame. Podem ser achados deste mesmo exame hepatomegalia e graus diversos de alterações das vias biliares, sedimento urinário, calcificações distróficas e lesões pancreáticas (HOFFMAN, 2003; MANTIS *et al.*, 2003; DE MARCO, 2010). Outros exames mais precisos para avaliar o encéfalo e detalhar alterações abdominais como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) possuem disponibilidade limitada e/ou custo elevado, além de requererem a realização do estudo sob anestesia geral, porém são bastante úteis na caracterização de neoplasias hipofisárias e eventuais invasões locais dos tumores adrenocorticais (GALAC, 2010; HERRTAGE & RAMSEY, 2012; BEHREND & MELIÁN, 2013; BEHREND, 2015).

### **2.3 Testes Diagnósticos Hormonais**

O diagnóstico definitivo dá-se através da soma de evidências clínicas, laboratoriais, imagísticas e de testes hormonais. O teste de supressão por baixa dose de dexametasona (TSBDD) é considerado como o de primeira escolha para triagem frente a um caso suspeito, tendo ainda a potencial vantagem de diferenciar a origem hipofisária ou adrenal. Para sua realização, são obtidas três amostras de soro ao longo de um mesmo dia para determinação de cortisol. A primeira (cortisol basal) é seguida da aplicação endovenosa de dexametasona em uma dose entre 0,01-0,015 mg/kg pela via endovenosa. São determinados, então, os valores de cortisol 4 e 8h após esta aplicação, respectivamente e conforme o valor confirma-se o diagnóstico (BEHREND & MELIÁN, 2013). Assumem-se como positivos, os pacientes com valores de cortisol 8h após dexametasona acima do ponto de corte do laboratório (normalmente > 1 µg/dL). A diferenciação entre origem pituitária ou adrenal dá-se pela comparação dos valores de cortisol 4h pós-dexametasona com o cortisol basal. Normalmente pacientes com tumores adrenocorticais funcionais não suprimem o cortisol 4h e 8h pós-dexametasona (variação < 50% do basal), ao passo



que nos casos de HPD uma marcada supressão do cortisol pode ser observada 4h após injeção de dexametasona (> 50% de supressão em relação ao basal) (BEHREND *et al.*, 2012).

Caso seja obtido um resultado negativo, e suspeite-se de falso-negativo, há a possibilidade da realização do Teste de Estímulo por ACTH (TeACTH), que é utilizado também para diagnóstico da doença em sua forma atípica ou iatrogênica. Para a realização deste exame como forma de diagnóstico é aplicada uma alíquota de 5µg/kg pela via endovenosa de ACTH sintético, acompanhada da mensuração do cortisol sérico entre 60 a 90 minutos após. Pacientes com HAC apresentam respostas exageradas do cortisol após estimulação (> 17 µg /dL, intervalo de referência de 6 a 17 µg /dL). No entanto, um TeACTH positivo não discrimina origem pituitária ou adrenal para o problema. Na verdade, os tumores adrenais tendem a ser menos responsivos ao estímulo pelo ACTH, reduzindo assim a sensibilidade do teste (BEHREND *et al.*, 2012).

A mensuração do ACTH endógeno (ACTHe) também pode ser utilizada como alternativa diagnóstica e diferenciação da origem pituitária ou adrenal. Os pacientes com HPD tipicamente apresentam valores elevados de ACTHe (> 40 pg/dL), ao passo que os pacientes com tumores adrenocorticais funcionais apresentam valores suprimidos deste hormônio (< 10 pg/dL). Porém ambos (TeACTH e ACTHe) dependem do acesso e disponibilidade da medicação (ACTH sintético) ou ensaio (eACTH); respectivamente, para serem efetuados de forma adequada (GILOR & GRAVES, 2011; BEHREND *et al.*, 2012; BEHREND & MELIÁN, 2013).

Como na maior parte dos casos a origem do HAC é a glândula hipófise, é de grande valia a avaliação de imagem e funcionalidade dessa estrutura via TC, RM e ACTHe, podendo assim aumentar a sensibilidade diagnóstica e delimitar a extensão da neoplasia. Outro teste endócrino não muito aplicado na rotina clínica é a avaliação da relação cortisol:creatinina urinária (RC:CU), sendo considerado um teste de elevada sensibilidade, porém baixa especificidade para o diagnóstico do HAC. Para sua adequada realização, o tutor deve colher a urina do paciente em casa, preferencialmente a primeira urina da manhã, para evitar interferência de estresse. Se a relação estiver elevada, pode-se submeter o paciente a um teste de supressão por dexametasona oral em casa com novas coletas de urina após 48 e 72 horas para verificar a supressão da produção de cortisol.

## 2.4 Terapêutica

O tratamento do HPD pode ser desafiador e, atualmente, a principal abordagem terapêutica é o emprego de fármacos para redução da cortisolemia (BEHREND, 2015). A medicação mais utilizada rotineiramente é o trilostano, um esteroide sintético inibidor competitivo da enzima 3 $\beta$ -HSD (3-beta-hidroxiesteroide desidrogenase). O trilostano também atua sobre as enzimas 21-hidroxilase e 11 $\beta$ -HSD (11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase) controlando assim a esteroidogênese adrenal especialmente sobre a síntese de cortisol (DRAZNER, 2006; RAMSEY, 2010; STOHLMAN, 2015).

O trilostano é de fácil acesso em grande parte do território nacional, porém ao agir em um sítio (adrenais) à distância da origem do distúrbio (hipófise) não parece ser eficaz em reduzir a secreção de ACTH e, inclusive, tende a trazer o efeito oposto pela ausência de *feedback* negativo via redução dos níveis de cortisol, provocando assim um aumento compensatório na secreção do ACTH hipofisário) (SIEBER-RUCKSTUHL *et al.*, 2006; TESHIMA *et al.*, 2009; GALAC *et al.*, 2010, BURKHARDT *et al.*, 2013). Além disso, observam-se ao longo do tratamento persistência e progressão da hiperplasia bilateral via ferramentas de imagem ultrassonográfica e/ou tomográfico, o que pode trazer complicações indesejadas como necrose aguda adrenal e/ou diferenciação em TAF (MANTIS *et al.*, 2003; BURKHARDT *et al.*, 2011; RUCKSTUHL *et al.*, 2012;).

Tradicionalmente o trilostano é administrado duas vezes ao dia na dose de 0,5 a 1 mg/kg, sempre após uma refeição para favorecer a absorção do medicamento. No entanto, ao longo do tempo as elevações da secreção endógena de ACTH promovidas pelo fármaco, e a consequente adrenomegalia, provoca necessidade de ajustes contínuos na dose do medicamento, chegando a necessidade de doses de até 5 mg/kg a cada 12 horas em alguns casos. O monitoramento dos pacientes se dá através da realização de TeACTH periódicos, onde procura-se associar o horário de realização do teste no pico de ação do trilostano (ao redor de 2h após administração). Neste intervalo, faixas de cortisol pós-ACTH entre 2 e 6  $\mu$ g/dL são associados a um excelente controle (BEHREND, 2015).

Existe ainda a possibilidade do uso do mitotano (quimioterápico adrenocorticolítico) para tal, porém os efeitos colaterais decorrentes do tratamento e relacionados a eventual indução de hipocortisolismo (vômitos, diarreia, falta de apetite, prostração intensa e óbito em casos mais graves) fazem necessária uma avaliação prévia do tutor e paciente para sua efetiva prescrição

(BEHREND & MELIÁN, 2013; BEHREND, 2015). Em seres humanos com HPD a intervenção de escolha é cirúrgica (hipofisectomia) (JAVORSKY *et al.*, 2013), porém a realidade de recursos, curva de aprendizado e acesso cirúrgico em Medicina Veterinária tornam esse procedimento inacessível na grande maioria dos centros, só sendo aplicada rotineiramente em poucos centros de referência no mundo. No entanto, nos casos de TAFs, a adrenalectomia vem sendo realizada rotineiramente e com sucesso, promovendo a cura do HAC. Contudo, antes da cirurgia uma adequada estabilização do paciente com uso do trilostano é recomendada para minimizar os riscos da cirurgia (BEHREND, 2015; MUSCHNER *et al.*, 2017).

A selegilina (L-Deprenyl, Anipryl<sup>®</sup>) é um inibidor da monoaminoxidase cerebral (MAO-B), uma enzima responsável pela degradação de aminas vasoativas como a dopamina. É empregada em seres humanos com síndrome de Parkinson (onde não há produção adequada de dopamina) e no tratamento da síndrome de disfunção cognitiva canina (SDCC), podendo trazer benefícios terapêuticos em animais com HPD ao elevar o tônus dopaminérgico e, conseqüentemente, reduzir a produção do ACTH na *pars intermedia*. A taxa de efeitos colaterais relacionados ao tratamento é baixa, tornando-a uma medicação relativamente segura. Em cães ainda são necessários estudos maiores para avaliar sua real eficácia no tratamento da SC como monoterapia ou associado ao trilostano (MILGRAM *et al.*, 1995; BRUYETTE *et al.*, 1997; RUEHL *et al.*, 1997; REUSCH *et al.*, 1999; RUEHL *et al.*, 1998; PETERSON, 1999; MILLS & LEDGER, 2001; BRADDOCK, 2003; BRADDOCK *et al.*, 2004; STOHLMAN, 2015).

A terapia medicamentosa voltada à hipófise é uma preocupação comum em humanos com HPD (ALEXANDRAKI & GROSSMAN, 2008; FLESERIU & PETERSENN, 2013; FLESERIU, 2015; LAU *et al.*, 2015), apresentando resultados variáveis em eficácia e sendo objeto de pesquisas clínicas e experimentais visando melhor tratamento dos pacientes refratários à hipofisectomia ou radiação, ou ainda inelegíveis para ambos procedimentos. O mesmo também é alvo de preocupação em cães com HPD (CASTILLO *et al.*, 2010).

Alguns estudos com semelhante objetivo foram realizados em cães com HPD com relativo sucesso, como o de Castillo *et al.* (2006) que demonstrou em um grupo de 22 cães a eficácia do ácido retinoico (ligante do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama ou PPAR- $\gamma$ ) em promover redução das dimensões do corticotrofina, cortisolemia e ACTHe; além de bom controle clínico e não associado a hepatotoxicidade ou maiores efeitos colaterais. No entanto, seu uso em escala clínica ainda não pode ser recomendado levando-se em consideração os custos com

o tratamento e dificuldades na obtenção da substância – principalmente quando comparados ao trilostano – mantém por ora seu uso apenas em caráter experimental.

As mesmas ressalvas são feitas sobre a avaliação do uso da cabergolina agindo nos receptores dopaminérgicos D2, o que melhora diversos aspectos imagísticos e laboratoriais como por exemplo a diminuição do corticotrofina, do ACTHe, do cortisol urinário; e um aumento significativo na expectativa de vida em cães com HPD, porém com eficácia de 42,5% (em um total de 40 animais) (CASTILLO *et al*, 2008). O mesmo estudo apontou ausência de maiores efeitos adversos além de um episódio isolado de vômito na primeira administração em 90% dos pacientes. No entanto, seria interessante a avaliação deste protocolo desenvolvido por pesquisadores argentinos em comparação ao trilostano (que não é comercializado na Argentina), pois o fármaco empregado no grupo controle (cetoconazol) não é atualmente o tratamento preconizado para o manejo clínico do HPD em cães (BEHREND, 2015).

O mesmo grupo de pesquisa encontrou resultados promissores com o uso do análogo da somatostatina pasireotida (CASTILLO *et al*, 2011) em 20 cães com HPD tratados sob dois diferentes protocolos terapêuticos (contínuo *vs* intermitente), demonstrando melhora clínica e redução das dimensões tumorais, valores de ACTHe e cortisol urinário em todos os animais. Apesar de três pacientes terem desenvolvido *diabetes mellitus* em quatro meses de tratamento, é impossível estabelecer uma associação causal entre o uso do fármaco e este desfecho levando em conta o fato de simplesmente o HAC *per se* ser um fator predisponente à esta condição (MICELI *et al*, 2017). Os custos de seu uso na rotina clínica também devem ser levados em consideração.

Teshima *et al* (2015) demonstraram o efeito supressivo sobre a expressão da 11 beta-hidróxi-esteróide desidrogenase (11 $\beta$ -HSD) do carbexolone (CBX) em 13 cães saudáveis, reduzindo de maneira efetiva seus níveis de ACTHe, cortisol e cortisona sem nenhum efeito adverso associado. Em seguida, foi utilizado em 6 cães com HPD (TESHIMA *et al*, 2016) durante um período de seis semanas e promoveu redução significativa dos níveis de ACTHe, cortisol pós-CRH e cortisona pós-CRH, porém com melhora parcial de alguns parâmetros bioquímicos e sem nenhum controle de poliúria/polidipsia (Pu/Pd) em todos os animais. Após duas semanas de descontinuidade do tratamento, os mesmos foram submetidos ao tratamento com trilostano e apresentaram resolução plena de Pu/Pd em 100% dos casos. No entanto, seus níveis de ACTHe apresentaram valores superiores aos níveis basais e ao tratamento com CBX (TESHIMA *et al*, 2016).

### 3 PROBLEMAS DA PESQUISA

Há benefício terapêutico do emprego da associação entre selegilina e trilostano no tratamento clínico do HPD em cães em relação a cães tratados com trilostano como monoterapia?

Existe possibilidade de utilização de dose mais baixa de trilostano, bem como menor necessidade de reajuste de dose em cães com HPD submetidos ao tratamento com a associação de selegilina e trilostano em relação a cães tratados com trilostano como monoterapia?

Esperam-se níveis menores de ACTHe em cães com HPD tratados com selegilina associada a trilostano em relação a cães tratados com trilostano como monoterapia?

É possível uma diminuição da adrenomegalia decorrente do tratamento com selegilina e trilostano quando comparado a monoterapia com trilostano em cães com HPD?

Há benefício cognitivo nos cães com HPD tratados com a associação selegilina e trilostano em relação aos tratados somente com trilostano?

#### **4 HIPÓTESES**

Pacientes com HPD tratados com uma associação entre selegilina e trilostano apresentam melhor resposta terapêutica em comparação a pacientes tratados em monoterapia com trilostano. Esta melhor resposta é caracterizada por um adequado controle terapêutico com doses menores de trilostano, secundária a uma menor secreção de ACTH endógeno e consequente menor adrenomegalia durante a terapia ao longo do tempo. Além disto, os pacientes tratados com associação selegilina e trilostano apresentam melhorias cognitivas em relação aos pacientes tratados somente com trilostano.

## 5 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral avaliar o impacto do uso conjunto de selegilina e trilostano no tratamento de cães com HPD em relação ao tratamento convencional com trilostano, além de comparar a avaliação cognitiva ao início e final do período de tratamento proposto.

### 5.1 Objetivos Específicos

- a) Comparar a resposta clínica de cães com HPD tratados com selegilina + trilostano em comparação a cães tratados com trilostano somente;
- b) Comparar a dose média de trilostano necessária para alcançar um adequado controle de cortisol pós-ACTH durante o tratamento frente aos dois tratamentos;
- c) Comparar o cortisol após estimulação por ACTH ao longo do tratamento em cães tratados com selegilina + trilostano em comparação a cães tratados com trilostano somente;
- d) Comparar a evolução na concentração de ACTH endógeno dos pacientes no momento do diagnóstico e durante o tratamento com selegilina + trilostano ou somente com trilostano;
- e) Comparar a evolução das dimensões e morfologia das adrenais dos pacientes ao exame ultrassonográfico durante o tratamento com selegilina + trilostano ou somente com trilostano;
- f) Comparar a resposta cognitiva dos pacientes durante o tratamento com selegilina + trilostano ou somente com trilostano.

## **6 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1 Delineamento experimental**

Ensaio clínico randomizado com *design* paralelo, pragmático, ou seja, desenhado para descrever as consequências do uso da terapia sob circunstâncias da prática clínica “real”. Este desenho possibilitou a inclusão de participantes com características heterogêneas, com critérios mais simples e menos rígidos, semelhantes aos vistos pelos clínicos na sua prática diária. Os controles receberam drogas ativas, e não placebos, com regimes de prescrição mais flexíveis (DOOHOO *et al*, 2009; MEDRONHO *et al.*, 2009). A alocação dos indivíduos nos grupos foi sistemática e aleatória de acordo com a ordem de entrada no estudo, sendo os casos ímpares alocados no grupo controle (terapia com trilostano) e os casos pares alocados no grupo intervenção (trilostano + selegilina). Esta definição de ímpares no grupo controle e pares no grupo experimental foi realizada por sorteio.

### **6.2 Local de Realização**

Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **6.3 Animais**

Tutores de 15 cães com diagnóstico recente de HPD foram convidados a participar do estudo por meio de concordância via preenchimento de termo de consentimento informado (Anexo 1). Os tutores concordantes com a participação foram convidados, também, ao preenchimento de um questionário de avaliação cognitiva a respeito de alguns padrões de comportamento de seu animal nos dias zero e 180 de inclusão no estudo (Anexo 2). Uma vez selecionados para participação, os pacientes foram divididos em dois grupos de forma aleatória alternada, segundo critério de ordem de inclusão no estudo, e foram respectivamente tratados com a associação selegilina + trilostano (Grupo Sel+Tri), ou somente com trilostano (Grupo Tri).

Foram adotados como critérios de exclusão, animais que já estivessem recebendo tratamento prévio, portadores de doença renal ou hepática grave, ou apresentando hipo/anorexia no



início do estudo. Da mesma forma, não foram admitidos pacientes que estivessem sendo medicados, ou recebendo eventualmente, medicações de associação contraindicada com selegilina (amitraz, antidepressivos tricíclicos e/ou opióides), o que impediria sua alocação no grupo Sel+Tri caso fossem destinados a tal grupo pela sua ordem de entrada no estudo. O diagnóstico de SC foi pautado no preenchimento de critérios compatíveis na apresentação, anamnese e sinais clínicos aliados às alterações em exames complementares (hematologia, bioquímica sanguínea, urinálise), ultrassonografia com imagem das adrenais (hiperplasia bilateral) e determinações hormonais que confirmem o quadro patológico (positividade ao TSBDD e/ou TeACTH).

#### **6.4 Procedimentos Experimentais**

Os pacientes do Grupo Sel+Tri foram tratados inicialmente com uma dose de 1mg/kg de selegilina, VO, SID + 0,5mg/kg de trilostano, VO, BID, ao passo que os pacientes do Grupo Tri foram tratados inicialmente com 0,5 mg/kg de trilostano, VO, BID. Os pacientes foram avaliados clinicamente e laboratorialmente ao diagnóstico inicial, e após 30, 90 e 180 dias do início do tratamento. Em cada uma destas avaliações foi realizada consulta clínica composta de anamnese geral e específica, exame físico geral, ultrassonografia abdominal e exames laboratoriais. As coletas de sangue foram realizadas com sistema à vácuo, de maneira asséptica, de 2 mL sangue da veia jugular em tubo com EDTA para hemograma, e adicionais 5 mL tubos sem anticoagulante, para determinação de parâmetros bioquímicos e hormonais (albumina, ALT, cálcio, colesterol, creatinina, FA, fósforo, glicose, ureia, triglicérides, sódio e potássio) em jejum alimentar de 12h. Amostra de urina em todas as avaliações para realização de urinálise (físico-químico e análise do sedimento) e determinação da relação proteína:creatinina urinária foram obtidas por micção espontânea ou cistocentese. A resposta aos tratamentos propostos também foi monitorada pela mensuração de cortisol pós-ACTH dos pacientes nos tempos 0, 30, 90 e 180 dias de tratamento, e mensuração do ACTHe nos referidos tempos.

## **6.5 Testes de Estimulação por ACTH e Mensuração de Cortisol**

Os TeACTH foram realizados de acordo com Aldridge *et al* (2016), partindo da aplicação de 1 µg/kg de tetracosactide (Synacthen® 0,25 mg/mL) por via intravenosa 2h após o paciente ter sido medicado com trilostano com alimento pelo seu tutor em casa. A injeção do ACTH sintético foi realizada com o auxílio de uma seringa de 1ml, lentamente e de maneira asséptica, na veia cefálica cranial ou safena. Após uma hora dessa aplicação, uma amostra de sangue de 2 mL foi obtida para mensuração de cortisol pós-ACTH. As coletas foram realizadas com assepsia seguida de venopunção jugular com sistema de colheita a vácuo. A determinação do cortisol pós-ACTH foi realizada em laboratório terceirizado (BET Labs/RJ), pelo método padrão-ouro internacional (radioimunoensaio) em alíquota de 1 mL de soro.

## **6.6 Mensuração de ACTH Endógeno (ACTHe)**

A dosagem de ACTHe foi realizada através da obtenção de uma amostra adicional de 2 ml de sangue obtido de maneira asséptica através de venopunção jugular, em tubos com anticoagulante EDTA previamente refrigerados em gelo em escamas e precedendo a aplicação do Synacthen, conforme previamente descrito (BEHREND *et al*, 2012). Imediatamente após o término, a amostra foi centrifugada (3000 rotações por minuto durante três minutos). O plasma resultante foi armazenado em alíquotas de 500 microlitros e mantidas congeladas a -80°C até posterior envio acondicionado em gelo seco para análise em laboratório credenciado, pelo método de eletroquimioluminescência (PROVET/SP).

## **6.7 Avaliação dos sinais clínicos**

O grau de severidade dos principais sinais clínicos associados ao HPD foi avaliado através de atribuição numérica atribuída em cada atendimento, onde: 0 = ausente, 1 = manifestação leve, 2 = manifestação moderada e 3 = manifestação intensa.

## **6.8 Avaliação da Função Cognitiva**

A função cognitiva e comportamental dos pacientes foi avaliada através da aplicação de um questionário (Anexo 2), e que foi respondido pelos tutores nos dias 0 (zero) e 180.

### **6.9 Cálculo Amostral e Análise estatística**

Baseado no desfecho esperado no qual pacientes em tratamento com trilostano têm elevação na produção de ACTH endógeno em mais de 95% dos casos, e na expectativa de documentação de que o uso conjunto de trilostano e selegilina atenuará esta elevação, foi estimado um n amostral entre 6 a 11 pacientes em cada grupo (contando com eventuais perdas ao longo do estudo de até 10% por grupo) utilizando a calculadora Epi Info com um poder de 80%, significância de 95% e razão exposto:não exposto de 1:1.

As análises de ACTH endógeno, cortisol pós-ACTH, espessura das glândulas adrenais ao exame ultrassonográfico e dosagem de trilostano foram comparadas entre grupos utilizando o teste de t pareado ou o teste de Wilcoxon U dentro e entre (entre 0 e 180 dias) grupos de tratamento, de acordo com a distribuição das variáveis como paramétricas ou não. Seguindo este critério, os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP ou mediana e intervalos, com um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). As curvas de sobrevivência foram construídas e avaliadas por meio do teste log-rank  $\chi^2$ .

## **7 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão serão apresentados na forma de artigo científico, que será submetido ao periódico *Journal of Veterinary Internal Medicine*.

1 **Selegiline and Trilostane Association for Canine Pituitary-Dependent**  
2 **Hyperadrenocorticism: Randomized Clinical Trial**

3 G.L.C Carvalho<sup>1</sup>; L.S. Meirelles<sup>1</sup>; C.C. Silva<sup>1</sup>; W.S. Neto<sup>2</sup>; P.V Furtado<sup>3</sup>; L. Machado<sup>1</sup>;  
4 F.S.M Martins<sup>1</sup>; F.P.S. Mello<sup>1</sup>; S.F. Valle<sup>4</sup>; A.G. Pöppl<sup>1,5</sup>

5 Institutions and Affiliations:

6 1 – Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), Faculdade de Veterinária, Universidade  
7 Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

8 2 – Laboratório de Epidemiologia Veterinária (EpiLab), Faculdade de Veterinária,  
9 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

10 3 – PROVET Medicina Diagnóstica, São Paulo/SP

11 4 – Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade  
12 Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

13 5 – Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do  
14 Rio Grande do Sul (UFRGS).

15

16 Running Head: Selegiline and Trilostane for Canine PDH

17

18 Keywords – hypercortisolism; ACTH; MAO inhibitor; pituitary-targeted.

19

20 Corresponding Author: G.L.C Carvalho, Faculdade de Veterinária/UFRGS, Av. Bento  
21 Gonçalves, 9090 – Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul; e-mail:  
22 [carvalho.vet@gmail.com](mailto:carvalho.vet@gmail.com)

23 Clinical and ultrasonographic evaluation and hormone testing were performed at Hospital  
24 de Clínicas Veterinárias (HCV) from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul

25 (UFRGS), Brazil. Routine blood tests and urinalysis were performed at Laboratório de  
26 Análises Clínicas (LACVet)/UFRGS. Cortisol measurements were performed at BET  
27 Laboratories-RJ/Brazil. Endogenous ACTH measurements were performed at PROVET  
28 Laboratories-SP/Brazil.

29 Authors declare no conflicts of interest; Authors declare no antimicrobial use off-label;  
30 This study was not supported for any grant;

31 Acknowledgements: Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias/UFRGS  
32 (LACVet/UFRGS); Hospital Veterinário da UFRGS (HCV/UFRGS); Laboratório  
33 PROVET/SP.

34

35 ***Abstract:***

36

37 **Background:** Canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH) is a common  
38 endocrine disorder. Clinical management usually demands lifelong trilostane therapy,  
39 which may cause endogenous ACTH (eACTH) elevation, adrenomegaly, and recurrent  
40 dose adjustments. Selegiline therapy have been prior indicated for canine PDH treatment at  
41 pituitary level, but not encouraged. However, there are no studies associating trilostane and  
42 selegiline for PDH treatment in dogs.

43 **Hypothesis/Objectives:** To evaluate clinical, pathological, imaging, and hormonal results  
44 in dogs with PDH treated with trilostane (Tri) or with trilostane and selegiline (Tri+Sel).

45 **Animals:** Fifteen client-owned dogs diagnosed with spontaneous PDH were evaluated: 8  
46 were treated with trilostane (Tri) and 7 were treated with trilostane and selegiline (Tri+Sel).

47 **Methods:** Randomized clinical trial; Dogs underwent clinical examination, serum  
48 biochemical analysis, urine analysis, abdominal ultrasound, endogenous ACTH, and post-

49 ACTH cortisol concentrations on days zero (D0), 30 (D30), 90 (D90) and 180 (D180) of  
50 treatment.

51 **Results:** There was no significant difference at 95% confidence level on endogenous  
52 ACTH variation between group Tri (median D0 = 20.85 pg/dL; median D180 = 79.0 pg/dL;  
53  $p = 0.07$ ) and group Tri+Sel (median D0 = 103 pg/dL; median D180 = 98.25;  $p = 0.57$ ).  
54 Both groups showed significant lower post-ACTH cortisol levels at the end of study (Tri  
55 median D0 = 15  $\mu\text{g/dL}$ ; D180 = 5.2  $\mu\text{g/dL}$ ;  $p = 0.002$  versus Tri+Sel median D0 = 17.23  
56  $\mu\text{g/dL}$ ; D180 = 2.26  $\mu\text{g/dL}$ ;  $p = 0.006$ ). Also, both groups needed trilostane dosage  
57 adjustments ( $p = 0.01$ ). However, no statistical difference was observed between the groups  
58 at the end of the study regarding eACTH or post-ACTH cortisol. Nonetheless, there was  
59 minor variation on left adrenal glands thickness of group Tri+Sel (left adrenal median D0 =  
60 0.65 cm; median D180 = 0.71;  $p = 0.7$ ) when compared with group Tri (left adrenal median  
61 D0 = 0.77 cm; median D180 = 0.97 cm;  $p = 0.09$ ). The same was observed for right adrenal  
62 glands thickness (Tri+Sel median D0 = 0.65 cm; median D180 = 0.58 cm;  $p = 0.2$  versus  
63 Tri median D0 = 0.58 cm; median D180 = 0.77 cm;  $p = 0.04$ ). Moreover, patients in group  
64 Tri+Sel seemed to have achieved better metabolic control throughout fructosamine and  
65 total cholesterol evaluation. Notwithstanding, no differences on clinical control or cognitive  
66 function status was perceived between groups.

67 **Conclusions and clinical importance:** Selegiline association with trilostane seems a safe  
68 and promising complementary therapy for canine HPD. However, further studies are need  
69 with larger patient number to clarify the real effect of this association, as well as longer  
70 follow up.

71

72 **Keywords:** hypercortisolism; ACTH; MAO inhibitor; pituitary-targeted.

### 73 ***Introduction***

74 Hyperadrenocorticism (HAC), is a common endocrine disease in dogs. Advances on  
75 clinical suspicion and on diagnosing techniques had elevated its occurrence in veterinary  
76 practice. Studies focused on the most appropriated treatment protocol for such condition are  
77 demanded<sup>1-8</sup>. The most common etiology of its development is the presence of a  
78 corticotropic adenoma (pituitary-dependent HAC – PDH)<sup>9</sup> and presently, patients who  
79 can't undergo surgery (hypophysectomy) have been treated with trilostane with relative  
80 success<sup>10</sup>.

81 This drug, which has been demonstrated as a safe and available option, has shown some  
82 undesirable effects in long-term therapy such as elevations on eACTH concentrations<sup>11,12,13</sup>  
83 adrenal hyperplasia,<sup>14,15</sup> and frequent dose adjustment requirements<sup>10</sup>. A great part of these  
84 can be explained by the aim of treatment (adrenal gland), which is not the original site of  
85 axis imbalance (pituitary adenoma).

86 Pituitary-targeted clinical management has been a challenge in veterinary and human  
87 medicine and inspired several researches on PDH in the last decades<sup>2-4,16-21</sup>. Nonetheless,  
88 no drug has been proven to be effective and financially feasible for routine use. Clinical  
89 trials evaluating drugs acting at pituitary level such as bromocriptine<sup>16</sup>, retinoic acid<sup>2</sup>,  
90 selegiline<sup>17-20</sup>, cabergoline<sup>3</sup>, pasireotide<sup>4</sup> and carbenoxolone<sup>21</sup> had been performed in dogs  
91 with PDH, but poor clinical results, or limitations on treatment cost, and availability did not  
92 encourage further work.

93 Until the present moment, only one recent study involving two drugs with different sites of  
94 action has been performed to evaluate outcome in dogs with PDH due to a  
95 macroadenoma<sup>22</sup>. Besides tumour size reduction in up to 60% of the patients receiving  
96 pasireotide, neither clinicopathological nor hormonal testing showed differences at the end



97 of the study. Selegiline (L-Deprenyl) is a selective mono-amino-oxidase-B (MAO-B)  
98 inhibitor which increases neural dopamine levels<sup>23-26</sup> and, consequently, has the potential of  
99 lowering ACTH levels at dog's *pars intermedia*<sup>17-20</sup>. It would be reasonable to presume a  
100 synergic effect of its association with trilostane as a treatment option.

101 The aim of the present study was to evaluate clinical, hematology, serum biochemistry,  
102 urine analysis, imaging, and hormonal features of dogs with PDH treated with a  
103 combination of selegiline and trilostane in comparison with trilostane monotherapy. The  
104 hypothesis tested were: lower eACTH and post-ACTH cortisol levels in the intervention  
105 group, as well as mitigate adrenal gland thickness enlargement and increasing in trilostane  
106 dosage requirements.

107

## 108 **Materials and Methods**

109 A randomized clinical trial was performed with 15 client-owned dogs diagnosed with  
110 spontaneous PDH diagnosed based on the presence of clinical signs, complete blood count  
111 (CBC), serum biochemistry, urine analysis, and ultrasonographic features compatible with  
112 HAC, associated with a low-dose dexamethasone suppression test (LDDST) as endocrine  
113 consent<sup>9</sup>. Animals were followed along 180 days from the beginning of therapy.

114 Patients were randomly allocated in two distinct regimens of treatment. Dogs with severe  
115 cardiac disease, chronic kidney disease (IRIS Staging 2 or greater), hepatic failure or  
116 hyporexia prior to study beginning were not included. Other exclusion criteria were:  
117 animals that had previously received any treatment for CS and those who were on treatment  
118 with drugs with no recommended association with selegiline (opioids, amitraz or tricyclic  
119 antidepressants).

120 This study was approved by the Universidade Federal do Rio Grande do Sul's Ethics  
121 Committee for Animal Experimentation under the registration number 31681. Also, a  
122 written consent was obtained from animal's tutors before inclusion in the study.

123

### 124 *Experimental procedures*

125 Patients included in group Tri were treated with trilostane<sup>a</sup> at an initial dosage of 0.5 mg/kg  
126 PO twice daily with food, whereas group Tri+Sel received initially trilostane 0.5 mg/kg PO  
127 twice daily with food, and selegiline<sup>b</sup> 1mg/kg PO once daily with food. At four different  
128 moments of treatment (basal – D0; 30 days – D30; 90 days – D90 and 180 days – D180)  
129 clinical evaluation with interview, endogenous eACTH measurement, ACTH stimulation  
130 test (ACTHst) to determine post-ACTH cortisol (performed 2 hours after trilostane  
131 administration), CBC, serum biochemistry, urine analysis, and abdominal ultrasound were  
132 performed. At each evaluation, an extensive clinical evaluation for clinical signs of HAC  
133 were performed. To further interpretation, these findings were graded in four levels: 0 =  
134 absent, 1 = mild manifestation, 2 = moderate manifestation, and 3 = severe manifestation.  
135 Endogenous ACTH was determined as previously described<sup>9</sup> with samples collected in pre-  
136 cooled EDTA tubes, which were immediately centrifuged. The resultant plasma was stored  
137 at -80°C until sent frozen in dry ice to analysis by eletrochemiluminescence<sup>c</sup>. Post-ACTH  
138 cortisol samples were collected 60 minutes after tetracosactide<sup>d</sup> (1 µg/kg) intravenous  
139 administration and determined by radioimmunoassay<sup>e</sup>. All ACTHst were performed 2 hours  
140 after trilostane pilling. The CBC, serum biochemistry and urine analysis were performed in  
141 automatized equipment. Abdominal ultrasound evaluations were all made by the same  
142 operator in Esaote equipment with a 12 MHz linear probe.

143

#### 144 *Statistical Analyses*

145 The analyses for clinical data, CBC, serum biochemistry, urine analysis, endogenous  
146 ACTH, post-ACTH cortisol, adrenal glands thickness and trilostane dosage were compared  
147 using paired t test or Wilcoxon U test between and within (among 0 and 180 days)  
148 treatment groups, according to whether the distribution of the variables was parametric or  
149 not. Following this criterion, results were expressed as average  $\pm$  SD or median and ranges,  
150 with a level of significance of 5% ( $p < 0.05$ ). Survival curves were constructed and  
151 evaluated by means of the log-rank  $\chi^2$  test. To perform statistical tests, it was used program  
152 R v.1.0.136.

153

#### 154 *Animals*

155 Median age was 9.75 years old (range 8-15) and breed distribution were as follows:  
156 Yorkshire terrier (5/15), Mongrel dog (4/15), Dachshund (2/15), Australian Cattle Dog  
157 (1/15), Bichon Frisé (1/15), English Cocker Spaniel (1/15) and Maltese (1/15). Tri group  
158 (n=8) was composed by one male and seven females, while Tri+Sel group (n=7) was  
159 composed by one male and six females. The median age on Tri group was 9.5y (range 8-  
160 14) whereas in Tri+Sel group it was 10y (range 8-15). All animals were gonadectomized.

161

#### 162 **Results**

163

#### 164 *Clinical evaluation and survival*

165 Only 1/8 animals from group Tri and 2/7 animals from group Tri+Sel presented isolated  
166 episodes of vomiting and hyporexia during the time of study. A brief withdrawal of  
167 treatment was enough to normalize clinical condition and restoration of appetite. One

168 patient on Tri+Sel group developed ketoacidotic *diabetes mellitus* between D90 and D180  
169 and was discharged from study, as well as two patients deceased by means not related to  
170 treatment (a car trample, and other by a hepatic tumor hemorrhage) between D30 and D90.  
171 One patient on Tri group was euthanized by decision of the owners due to extreme lethargy  
172 and muscle weakness between D90 and D180. There were no evident differences on the  
173 major clinical signs at presentation, and at the end of the study between groups. By the  
174 same way, no significative cognitive improvement was observed in any group, besides in  
175 some patients of both groups an evident cognitive improvement was documented by  
176 owners. However, both protocols showed good clinical response time long within each  
177 group. Survival distribution is shown in Figure 1 and clinical findings are shown in Table 1.  
178

#### 179 ***Complete blood count, serum biochemistry and urine analysis***

180 No relevant difference was observed in CBC within groups before and after treatment, as  
181 well as between groups at the end of study (Table 1). Serum biochemistry and relevant  
182 urine analysis aspects are shown in Table 2. There was a significantly reduction in serum  
183 total cholesterol in group Tri+Sel ( $p = 0.04$ ). Also, group Tri showed a significant elevation  
184 in serum fructosamine levels during the period studied ( $p < 0.01$ ), while the group Tri+Sel  
185 did not ( $p = 0.8$ ). A statistically reduction in total plasmatic protein ( $p = 0.04$ ) was observed  
186 in group Tri+Sel at T180.

187

#### 188 ***Adrenal glands thickness***

189 There was minor variation on left adrenal glands thickness of group Tri+Sel (median D0 =  
190 0.65 cm; median D180 = 0.71;  $p = 0.7$ ), as well as observed on right adrenal glands  
191 (median D0 = 0.65 cm; median D180 = 0.58 cm;  $p = 0.2$ ). In contrast, adrenal glands

192 thickness varied more obviously in group Tri: left adrenal median D0 = 0.77 cm; median  
193 D180 = 0.97 cm ( $p = 0.09$ ), right adrenal median D0 = 0.58 cm; median D180 = 0.77 cm ( $p$   
194 = 0.04). Figure 2 shows boxplots for adrenal gland thickness before and after treatment in  
195 both groups.

196

### 197 *Hormone concentrations and endocrine testing*

198 Individual eACTH concentrations along the study are presented in Figure 3. Median  
199 eACTH and their respective quarts for both groups are shown in Figure 4A and 4B. There  
200 was no significant difference at 95% confidence level on eACTH variation between group  
201 Tri+Sel (median D0 = 103 pg/dL; median D180 = 98.25;  $p = 0.57$ ) and group Tri (median  
202 D0 = 20.85 pg/dL; median D180 = 79.0 pg/dL;  $p = 0.07$ ). Also, there was no statistical  
203 difference between eACTH at D0 or at D180 between groups.

204 Both groups showed significant lower post-ACTH cortisol levels at the end of study when  
205 compared with their basal levels: Tri+Sel median D0 = 17.23  $\mu\text{g/dL}$ ; D180 = 2.26  $\mu\text{g/dL}$ ;  $p$   
206 = 0.006 *versus* Tri median D0 = 15.02  $\mu\text{g/dL}$ ; D180 = 5.2  $\mu\text{g/dL}$ ;  $p = 0,002$ ). Figure 5A and  
207 5B shows median post-ACTH cortisol concentration and their respective quarts. Also, there  
208 was no statistical difference between post-ACTH cortisol at D0 or at D180 between groups.

209

### 210 *Trilostane dosage readjustments*

211 Both groups needed trilostane dose readjustments and finish the study period using greater  
212 relative dosages (mg/kg) then at the beginning ( $p = 0.01$ ). Despite the final trilostane  
213 relative dose was about twofold the initial dose in group Tri+Sel (median D0 = 0.55 mg/kg;  
214 median D180 = 0.98 mg/kg), and threefold the in group Tri (median D0 = 0.57 mg/kg;

215 median D180 = 1.66 mg/dL), there was no statistical difference in final doses between  
216 groups ( $p = 0.07$ ).

217

## 218 **Discussion**

219 Although no significant difference was observed in major routine exams over time, serum  
220 cholesterol levels showed significant reduction in Tri+Sel while patients in Tri group did  
221 not. This can be a positive result when evaluating it as a risk factor for pancreatitis, insulin  
222 resistance, atherosclerosis, and several biliary disorders<sup>27</sup> associated with this condition in  
223 dogs with HAC. Other significant difference observed was a reduction in total plasmatic  
224 protein in group Tri+Sel at D180, which does not seem to be a direct effect of the treatment  
225 itself and can be due to the heterogeneity of the disease in each animal. The same could  
226 explain the absence of relevant differences among other variables studied. However, the  
227 fact that serum fructosamine levels were greater in group Tri at end of the study would  
228 indicate a poorer glycemic control<sup>28</sup>, and greater *diabetes mellitus* risk<sup>29</sup>, in animals treated  
229 with trilostane. By this point of view, the association of selegiline with trilostane would  
230 promote a better metabolic control in PDH dogs. However, one patient that died in the  
231 study in group Tri+Sel was due to sudden *diabetes mellitus* and subsequent diabetic  
232 ketoacidosis development, which is not uncommon in patients with PDH<sup>28,29</sup>.

233 The absence of adrenal thickness enlargement observed in both adrenal glands in group  
234 Tri+Sel agrees with the hypothesis of eACTH mitigation by selegiline. Moreover, it  
235 became clear, as previously described<sup>14,15</sup>, adrenal gland enlargement in the group treated  
236 with trilostane as monotherapy in a brief period (six months). By this way, a benefit of  
237 selegiline and trilostane association would be postulated in dog's PDH treatment and may  
238 avoid this sometimes-worrisome adrenal response to trilostane therapy. Seems reasonable

239 that an enlarged pituitary dopaminergic tonus would help to reduce ACTH production, in  
240 normal and in ACTH-secreting pituitary adenomas, due to the dopamine receptor subtype 2  
241 (D<sub>2</sub>) expression in anterior and intermediate pituitary lobes<sup>30,31</sup>.

242 Part of adverse effects associated to trilostane treatment for PDH is due to expected  
243 elevations on eACTH concentrations over time<sup>11-13,32</sup>. Despite the achievement of good  
244 clinical and serum biochemistry control, dose adjustments were necessary<sup>10</sup>. No significant  
245 difference was observed on eACTH levels on Tri+Sel group when compared with Tri. Post-  
246 ACTH cortisol levels showed good control at the end of study on both groups. Moreover,  
247 trilostane and selegiline association did not avoid the need for trilostane dose increases  
248 during the period studied, neither promoted a statistically significant lower final trilostane  
249 dose when compared with trilostane as monotherapy in this small population evaluated.

250 However, the *p* values near significance levels would be further tested by increasing sample  
251 size. The initial number of dogs calculated to enter the study was six in each group.  
252 Notwithstanding, due to initial follow up losses, a few more patients were recruited in each  
253 group. Even though, the number of patients that reached the end of the study was smaller in  
254 group Tri+Sel than desired. This fact may have impaired a better demonstration of  
255 trilostane and selegiline association for canine PDH medical treatment.

256 Interestingly, despite diagnosis of PDH was based on clinical, hematological, serum  
257 biochemistry, and imaging features added to a positive result on LDDST) test<sup>9</sup>, an ACTHst  
258 was performed on D0 before treatment in all patients. The ACTHst sensibility for diagnosis  
259 in this population was only 66.6%. This fact emphasizes LDDST as first-line screening test  
260 for HAC as suggested by previous consensus<sup>9</sup>.

261 Recent research has shown an association between chronic glucocorticoids exposure as in  
262 HAC, and the development of cognitive impairment in humans<sup>33,34</sup>. Selegiline can be used

263 to treat canine cognitive dysfunction in elder dogs<sup>22-25</sup>, although no benefits on this aspect  
264 were observed on Tri+Sel group when compared to Tri. However, this was not the main  
265 scope of this work. Selegiline dosages were not modified during the study to avoid  
266 intervention on results, but sometimes it can be needed to achieve better cognitive control  
267 of dogs undergoing treatment.

268 Unfortunately, we could not perform neuroimaging studies such as computed tomography  
269 or magnetic resonance due to logistic and financial issues. As important tools when  
270 assessing pituitary aspect and corticotropinomas monitoring, these could be useful in  
271 making a correlation with eACTH levels (specially the greatest values) and would have  
272 explained the absence of an obvious eACTH difference during treatment in both groups.  
273 Dopaminergic therapies previously related showed reduction in pituitary tumoral size and  
274 ACTH secretion in<sup>3</sup>, while trilostane therapy is typically associated with increased ACTH  
275 production<sup>11-13</sup>.

276 Due to the heterogeneous features of HAC among dogs and its levels of manifestation in  
277 each patient, although diluted by the study design, aspects such severity, and time of illness  
278 could have been key factors on patients` outcome. This can also be said about individual  
279 response to treatment, which may have influenced the results on both groups.

280 When hypophysectomy is not possible, pituitary-targeted medical treatment seems to be a  
281 rational choice<sup>1-4,6-8</sup>. Corticotroph adenomas are the original cause of cortisol levels  
282 imbalance, and complementary site of action drug protocols may mitigate the continuous  
283 eACTH concentration rising and, consequently, adrenomegaly. This can avoid major  
284 trilostane dosing requirements and associated side effects, despite this did not became clear  
285 in this study. However, a recent study has shown that pituitary somatostatin receptor  
286 targeted-therapies may also be promising, and safe as combined therapy<sup>22</sup>.



287 Selegiline associated with trilostane seemed to arrest adrenomegaly, and to promote a better  
288 metabolic control than trilostane monotherapy. Also, this association showed to be a secure  
289 association so far. Further studies evaluating greater number of patients for longer periods,  
290 added to neuroimaging features may be helpful in better evaluating the effects of this  
291 protocol. As well, other drug associations could be evaluated on this same way. In this  
292 study, it was not possible to attend these suggestions due to costs, labor, and time-  
293 limitations.

294

## 295 **References**

- 296 1. CASTILLO VA, GALLELLI MF. Corticotroph adenoma in the dog: pathogenesis and  
297 new therapeutic possibilities. *Research in Veterinary Science* 2010; 88:26-32
- 298 2. CASTILLO VA, GIACOMINI D, PAEZ-PEREDA M et al. Retinoic Acid as a novel  
299 medical therapy for Cushing's disease in dogs. *Endocrinology* 2006; 147(9):4438-4444
- 300 3. CASTILLO VA, GOMEZ NV, LALIA JC et al. Cushing's disease in dogs: Cabergoline  
301 treatment. *Research in Veterinary Science* 2008; 85:26-34
- 302 4. CASTILLO VA, THEODOROPOULOU M, STALLA J et al Effect of SOM230  
303 (Pasireotide) on corticotropic cells: action in dogs with Cushing's disease *Research in*  
304 *Veterinary Science* 2011; 34:124-136
- 305 5. BRADDOCK JA. Medical treatment of hyperadrenocorticism in the dog. *Australian*  
306 *Veterinary Journal* 2003; 82:272-277
- 307 6. LABEUR M, THEODOROPOULOU M, SIEVERS C et al. New aspects in the diagnosis  
308 and treatment of Cushing's disease. *Pituitary today: molecular, physiological and clinical*  
309 *aspects* 2006; 35:169-178

- 310 7. FLESERIU M, PETERSENN S. New avenues in the medical treatment of Cushing's  
311 disease: corticotroph tumor targeted therapy. *Journal of Neuro-oncology* 2013; 114(1):1-11
- 312 8. ALEXANDRAKI KI, GROSSMAN AB. Pituitary-targeted medical therapy of  
313 Cushing's disease. *Expert opinion on investigational drugs* 2008; 17(5):669-677
- 314 9. BEHREND EN, KOOISTRA HS, NELSON R et al. Diagnosis of spontaneous canine  
315 hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM consensus statement (small animal) 2012; 27:1292-  
316 1304
- 317 10. RAMSEY IK. Trilostane in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal*  
318 *Practice* 2010; 40(2):269-283
- 319 11. GALAC S, BUIJTEL JJCWM, MOL JA et al. Effects of trilostane on the pituitary-  
320 adrenocortical and renin-aldosterone axis in dogs with pituitary-dependent  
321 hyperadrenocorticism. *The Veterinary Journal* 2010; 183:75-80
- 322 12. TESHIMA T, HARA Y, TAKEKOSHI S et al. Trilostane-induced inhibition of cortisol  
323 secretion results in reduced negative feedback at the hypothalamic-pituitary axis. *Domestic*  
324 *Animal Endocrinology* 2009; 36:32-44
- 325 13. SIEBER-RUCKSTUHL NS, BORETTI FS, WENGER M et al. Cortisol, aldosterone,  
326 cortisol precursor, androgen and endogenous ACTH concentrations in dogs with pituitary-  
327 dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Domestic Animal Endocrinology*  
328 2006; 31:63-75
- 329 14. MANTIS P, LAMB CR, WITT AL et al. Changes in ultrasonographic appearance of  
330 adrenal glands in dogs with Hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Journal of*  
331 *Veterinary Radiology and Ultrasound* 2003; 44(6):682-685
- 332 15. RUCKSTUHL NS, NETT CS, REUSCH CE. Results of clinical examinations,  
333 laboratory tests, and ultrasonography in dogs with pituitary-dependent

- 334 hyperadrenocorticism treated with trilostane. American Journal of Veterinary Research  
335 2002; 63(4):506-512
- 336 16. RIJNBERK A, BELSHAW BE. An alternative protocol for the medical management of  
337 canine pituitary-dependent Hyperadrenocorticism. The Veterinary Record 1988;  
338 122(20):486-488
- 339 17. BRUYETTE DS, RUEHL WW, ENTRIKEN T et al. Management of canine pituitary-  
340 dependent hyperadrenocorticism with L-Deprenyl (Anypryl). Veterinary Clinics of North  
341 America: Small Animal Practice 1997; 27:273-286
- 342 18. REUSCH CE, STEFFEN T, HOERAUF A. The efficacy of L-Deprenyl in dogs with  
343 pituitary-dependent Hyperadrenocorticism. Journal of Veterinary Internal Medicine 1999;  
344 13:291-301
- 345 19. PETERSON ME. Medical treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in  
346 dogs: should L-Deprenyl (Anypryl) ever be used? Journal of Veterinary Internal Medicine  
347 1999; 13:289-290
- 348 20. BRADDOCK JA, CHURCH DB, ROBERTSON ID et al. Inefficacy of selegiline in  
349 treatment of canine pituitary-dependent Hyperadrenocorticism. Australian Veterinary  
350 Journal 2004; 82(5):272-277
- 351 21. TESHIMA T, MATSUMOTO H, OKUSA T et al. Carbenoxolone disodium treatment  
352 for canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism. PLoS One 2016; 11(11):1-10
- 353 22. LOTTATI M, BRUYETTE DS. Outcomes of the addition of Pasireotide to traditional  
354 adrenal-directed treatment for dogs with pituitary-dependent Hyperadrenocorticism  
355 secondary to macroadenoma: 9 cases (2013-2015). Journal of the American Veterinary  
356 Medical Association 2018; 252(11):1403-1408

- 357 23. MILGRAM NW, IVY GO, MURPHY MP et al. Effects of chronic L-Deprenyl oral  
358 administration in dogs. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1995; 51:421-428
- 359 24. RUEHL WW, NEILSON J, HART B et al. Therapeutic action of L-Deprenyl in dogs: a  
360 model of human brain aging. *Advances in Pharmacology* 1998; 45:316-319
- 361 25. RUEHL WW, ENTRIKEN TL, MUGGENBURG BA et al. Treatment with L-Deprenyl  
362 prolongs life in elderly dogs. *Life Sciences* 1997; 61:1037-1044
- 363 26. MILLS, D; LEDGER, R. The effects of oral selegiline hydrochloride on learning and  
364 training in the dog: a psychobiological interpretation. *Progress in Neuro-*  
365 *Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2001; 25(8):1597-1613
- 366 27. XENOULIS P, STEINER JM. Canine hyperlipidaemia. *Journal of Small Animal*  
367 *Practice* 2015; 56:595-605
- 368 28. MICELI DD, GALLELLI MF, CABRERA-BLATTER MF et al. Low dose of insulin  
369 detemir controls glycaemia, insulinemia and prevents diabetes mellitus progression in the  
370 dog with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Research in Veterinary Science* 2012;  
371 93(1):114-120
- 372 29. MICELI DD, PIGNATARO OP, CASTILLO VA. Concurrent hyperadrenocorticism  
373 and diabetes mellitus in dogs. *Research in Veterinary Science* 2017; 115:425-431
- 374 30. DE BRUIN C, HANSON JM, MEIJ BP et al. Expression and functional analysis of  
375 dopamine receptor subtype 2 and somatostatin receptor subtypes in canine Cushing's  
376 disease. *Endocrinology* 2015; 149(9): 4357-4366
- 377 31. SATO A, HARA Y. Protein expression of somatostatin receptor 2, somatostatin  
378 receptor 5 and dopamine D2 receptor in normal pituitary gland and ACTH-secreting  
379 pituitary adenomas in dogs. *Research in Veterinary Science* 2018; 119:61-66

- 380 32. BURKHARDT WA, GUSCETTI F, BORETTI FS et al. Adrenocorticotrophic hormone,  
381 but not trilostane, causes severe adrenal hemorrhage, vacuolization, and apoptosis in rats.  
382 Domestic Animal Endocrinology 2011; 40:155-164
- 383 33. RESMINI E, SANTOS A, WEBB SM. Cortisol excess and the brain. Frontiers of  
384 hormone research 2016; 46:74-86
- 385 34. MAO WY, YOU H, XING B et al. Advances in evaluation of cognitive impairment in  
386 patients with Cushing's disease. Zhongguo Yu Xue Ke Xue yuan Xue Bao 2016;  
387 38(6):735-738

388

389 ***Footnotes:***390 *a:* Vetoryl – Dechra Veterinary Products391 *b:* Jumexil - Farmalab392 *c:* Immulite 1000 - Siemens393 *d:* Synacthen – Novartis Pharma394 *e:* ImmuChem – MP Biomedicals

395

396 ***List of Abbreviations:***

397 PDH: pituitary-dependent Hyperadrenocorticism

398 eACTH: endogenous adrenocorticotrophic hormone

399 Tri: trilostane

400 Sel+Tri: selegiline and trilostane

401 LAdr: Left adrenal gland

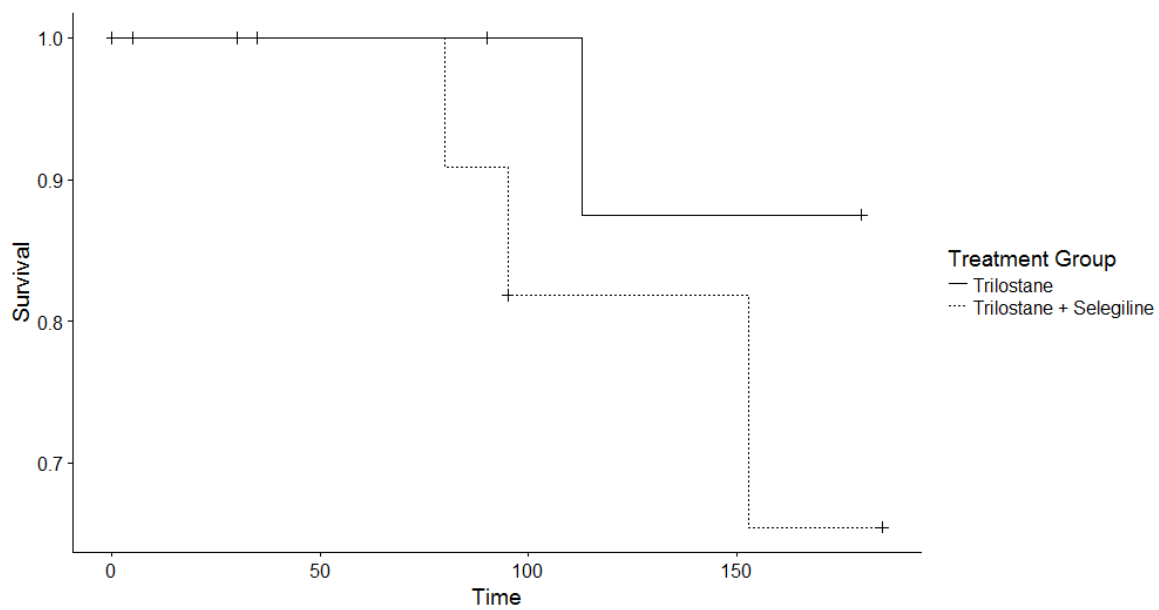
402 RAdr: Right adrenal gland

403 LDDST: Low-dose dexamethasone suppression test

404 ACTHst: ACTH stimulation test

405 D<sub>2</sub>: dopamine receptor subtype 2

406

407 **FIGURES AND LEGENDS**408 **Figure 1** - Survival distribution of the patients in the study.

409

410

411

412

413

414

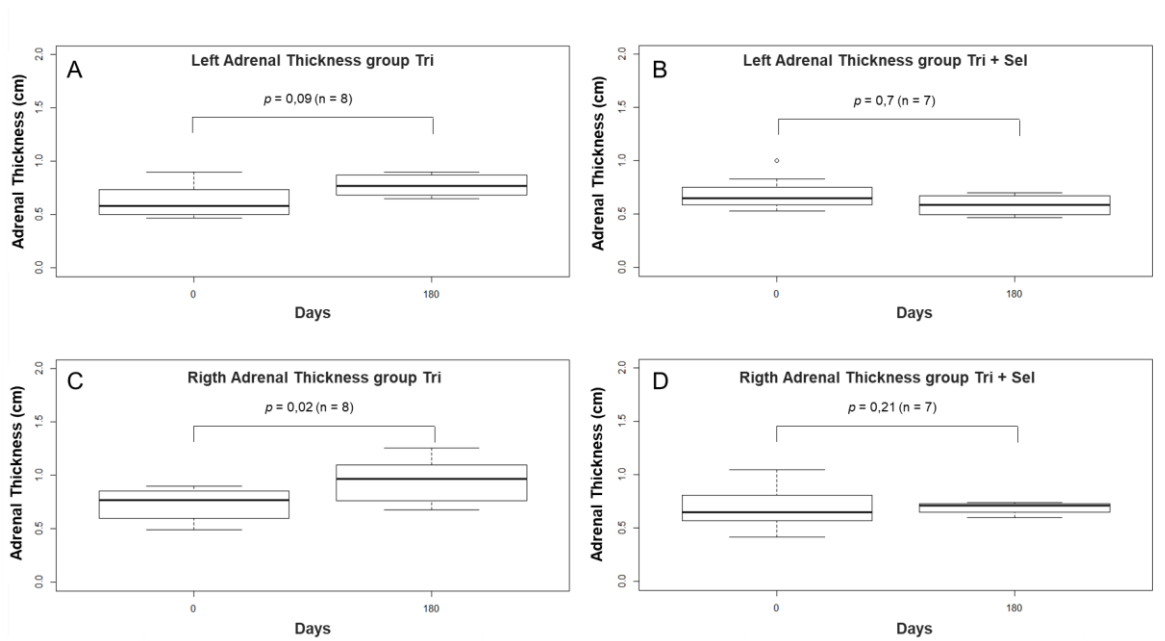
415

416

417

418

419

420 **Figure 2.** Ultrasonographic evaluation of left and right adrenal gland's thickness. A) Left421 adrenal thickness before and after treatment in group Trilostane ( $p = 0,09$ ). B) Left adrenal422 thickness before and after treatment in group Trilostane + Selegiline ( $p = 0,7$ ). C) Right423 adrenal thickness before and after treatment in group Trilostane ( $p = 0,04$ ). D) Right424 adrenal thickness before and after treatment in group Trilostane + Selegiline ( $p = 0,2$ ).

425

426

427

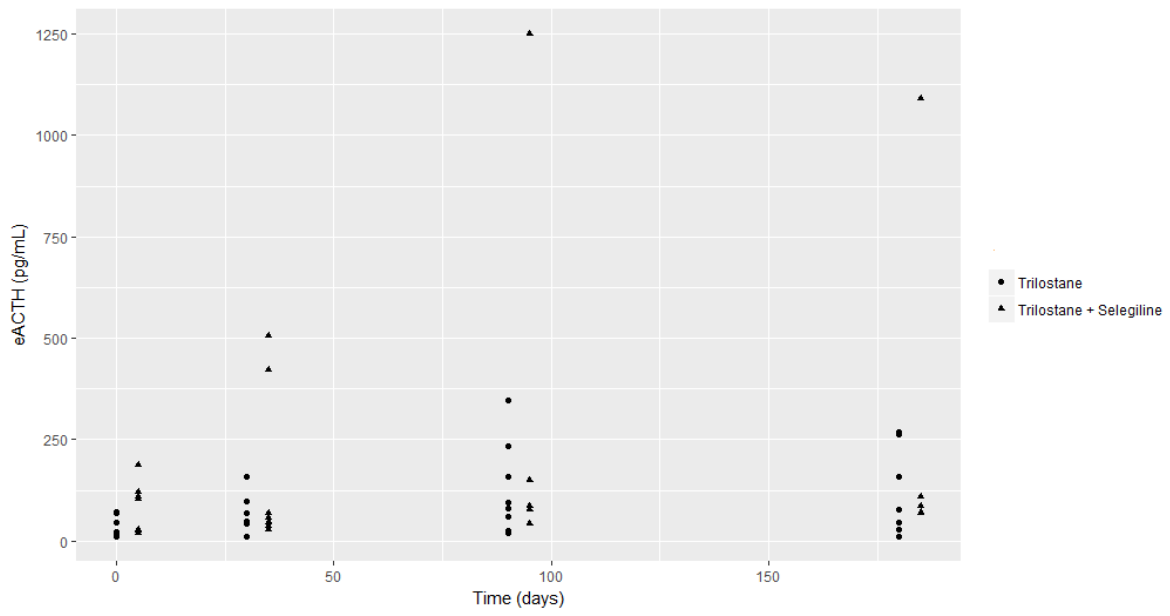
428



429

430

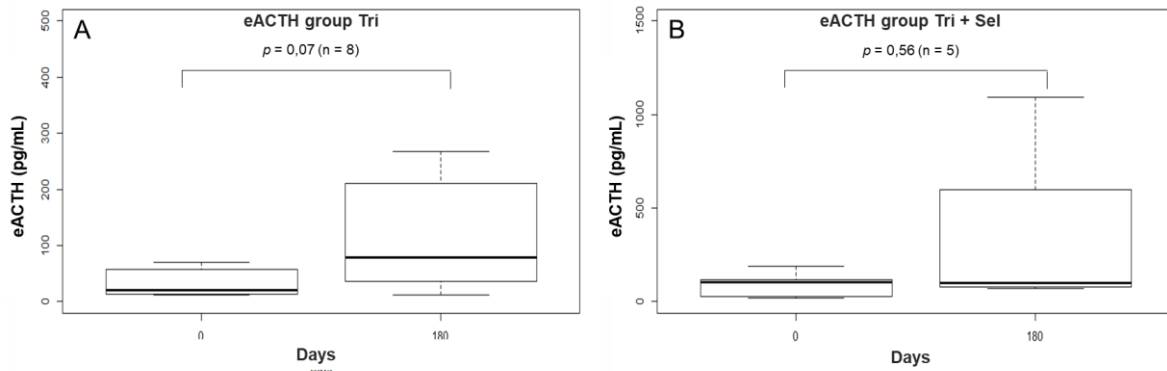
**Figure 3.** Individual endogenous ACTH evolution along the study in each group.



431

432

433

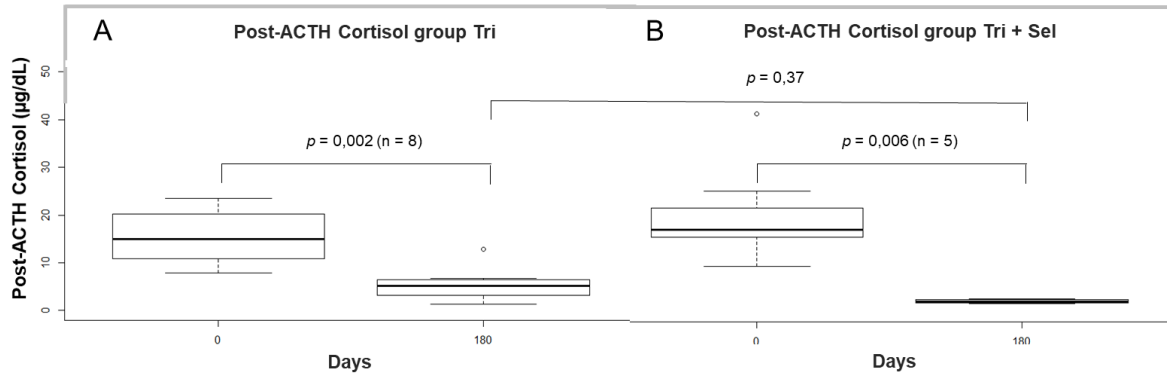
434 **Figure 4.** Median eACTH and their respective quarts before and after treatment. A) Median435 eACTH and respective quarts in group Trilostane ( $p = 0.07$ ). B) Median eACTH and436 respective quarts in group Trilostane + Selegiline ( $p = 0.57$ ).

437

438

439

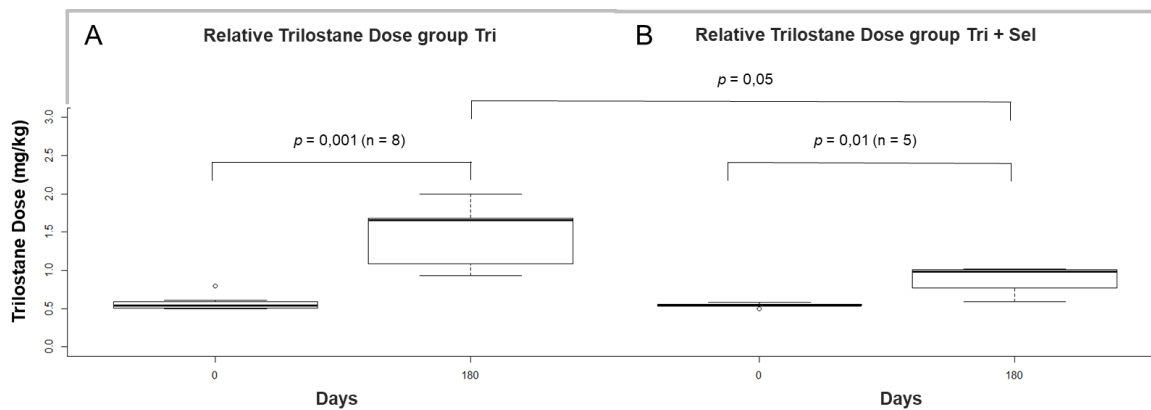
440  
441 **Figure 5.** Median post-ACTH cortisol concentration at beginning and at the end of study  
442 period in group Trilostane (A), and in group Trilostane + Selegiline (B).



443

444

445  
446 **Figure 6.** Median relative trilostane dosage (mg/kg) at beginning and at the end of study  
447 period in group Trilostane (A), and in group Trilostane + Selegiline (B).



448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461 **Table 1:** Clinical findings in groups Tri and Tri+Sel at day zero, and at the final of the  
 462 study. Values are expressed in median or mean accordingly with its parametric or not-  
 463 parametric distribution and range (minimum - maximum).

464

Parameter	Group Tri T0 (n=8)	Group Tri T180 (n=7)	<i>P</i>	Group Tri+Sel T0 (n=7)	Group Tri+Sel T180 (n=4)	<i>P</i>
	Median/Mean (Min-Max)	Median/Mean (Min-Max)		Median/Mean (Min-Max)	Median/Mean (Min-Max)	
Polyuria	2 (0-3)	0 (0-1)	0.01*	1 (0-3)	0 (0-1)	0.05
Polydipsia	2 (0-3)	0 (0-1)	0.01*	2 (0-3)	0 (0-1)	0.05
Polyphagia	3 (1-3)	2 (0-3)	0.3	2 (0-3)	1 (0-2)	0.3
Panting	2 (0-3)	1 (0-3)	0.3	2 (0-2)	0 (0-3)	0.3
Alopecia	0 (0-2)	0 (0-1)	0.3	1 (0-3)	0 (0-3)	0.09
Muscle weakness	0.5 (0-3)	0.5 (0-1)	0.7	2 (0-2)	0.5 (0-2)	0.2

465 T0: time zero, T180: 180 days treatment, n: number of patients, Min: minimum, Max:  
 466 maximum. *P*: significance probability.

**Table 2.** Complete blood count parameters in groups Tri and Tri+Sel at day zero, and at the final of the study. at day zero, and at the final of the study. Values are expressed in median or mean accordingly with its parametric or not-parametric distribution and range (minimum – maximum).

Parameter	Group Tri T0 (n = 8)	Group Tri T180 (n = 7)	<i>P</i>	Group Tri+Sel T0 (n = 7)	Group Tri+Sel T180 (n = 4)	<i>P</i>	Reference Interval
	Median/Mean (Min-Max)	Median/Mean (Min-Max)		Median/Mean (Min-Max)	Median/Mean (Min-Max)		
RBC (10 <sup>6</sup> /uL)	7.1 (5.95-8.54)	7.9 (6.96-9.02)	1	6.9 (5.34-8.26)	7.1 (6.77-7.84)	1	5.5 - 8.5
Hb (g/dL)	16.3 (13-19.9)	17.8 (15.3-20.5)	0,27	15.8 (12.5-18.7)	15.7 (13.7-17.3)	0.9	12 - 18
Ht (%)	47.6 (35-55)	50.7 (44-57)	0.33	47 (38-54)	46.2 (40-52)	0.8	37 - 55
WBC (10 <sup>3</sup> /uL)	10.8 (7.7-14.2)	10.7 (7.5-13.5)	0.94	8.8 (6-12.5)	8 (6.2-9.8)	0.5	6 - 17
Neu (%)	77.5 (60-91)	71.4 (60-81)	0.18	76 (58-89)	68.2 (54-81)	0.3	60-77
Eos (%)	2.1 (0-5)	4.5 (0-10)	0.21	3.7 (1-12)	7.7 (2-15)	0.2	2-10
Mono (%)	6.6 (2-12)	5.4 (2-11)	0.44	5.8 (2-11)	5.5 (3-8)	1	3-10
Lymph (%)	13.6 (5-30)	18.5 (7-27)	0.22	14.4 (9-24)	18.5 (10-29)	0.4	12-30
PLT (10 <sup>3</sup> /uL)	362.7 (232-730)	305 (190-360)	0.82	461.4 (300-520)	425.5 (320-500)	0.6	200 - 500

T0: time zero, T180: 180 days treatment, n: number of patients, Min: minimum, Max: maximum, *P*: significance probability, RBC: red cell blood count, Hb: hemoglobin, Ht: hematocrit, WBT: white cell blood count, Neu: neutrophils, Eos: eosinophils, Mono: monocytes, Lymph: lymphocytes, PLT: platelets.

**Table 3.** Serum biochemistry and urinary parameters in groups Tri and Tri+Sel at day zero, and at the final of the study. Values are expressed in median or mean accordingly with its parametric or not-parametric distribution and range (minimum – maximum).

Parameter	Group Tri T0 (n = 8)	Group Tri T180 (n = 7)	<i>P</i>	Group Tri + Sel T0 (n = 7)	Group Tri + Sel T180 (n = 4)	<i>P</i>	Reference Interval
	Median/Mean (Min-Max)	Median/Mean (Min-Max)		Median/Mean (Min- Max)	Median/Mean (Min-Max)		
Albumin (g/dL)	3.37 (2.6-3.7)	3.59 (3.2-3.9)	0.25	3.51 (29-39)	3.41 (3.2-3.6)	0.66	2.6 – 3.3
ALP (UI/L)	217.9 (41-582)	141 (62-290)	0.69	1620 (63-6107)	444.2 (54-941)	0.23	<156
ALT (UI/L)	56.2 (26-145)	76.4 (32-167)	0.26	244 (34-647)	119.5 (50-200)	0.5	<102
Cholesterol (mg/dL)	226.7 (167-289)	205 (140-256)	0.45	306 (167-661)	186 (153-211)	0.04*	135 - 270
Creatinine (mg/dL)	0.62 (0.4-1.2)	0.72 (0.58-0.9)	0.27	0.56 (0.2-0.9)	0.8 (0.5-0.8)	0.44	0,5 - 1,5
Fructosamin (umol/L)	202 (181-290)	264.2 (222-303)	<0.01*	216.8 (177-257)	222.5 (194-277)	0.8	170 - 338
Glucose (mg/dL)	124.1 (97-151)	118.5 (82-165)	0.6	118.7 (78-160)	122.5 (78-160)	0.64	65 – 118
Phosporus (mg/dL)	5.1 (4.4-6.4)	4.5 (2.9-5.9)	0.82	5 (2.9-7.6)	3.3 (1.1-5.2)	0.23	2.6 - 6.2
Potassium (mEq/L)	4.4 (3.4-5.1)	4.6 (3.8-6.3)	0.66	5 (3.5-5.6)	4.9 (4.4-5.1)	0.81	3.9 - 5.65
Sodium (mEq/L)	142.7 (137-157)	149.4 (139-160)	0.07	143.9 (138-153)	143.1 (138-153)	0.77	141 - 153
Total Calcium (mg/dL)	10.1 (9.2-11)	9.5 (8-12)	0.3	10.4 (2.9-7.6)	9.9 (8.2-11.4)	0.51	9 - 11.3
TPP (g/dL)	6.74 (6.7-7.4)	7.3 (6.2-8.9)	0.19	7.44 (6.7-8.8)	6.72 (6.5-7)	0.04*	5.4 - 7.1
Triglycerides (mg/dL)	370.5 (142-1191)	295.1 (74-744)	0.6	233.8 (157-414)	144.7 (38-153)	0.07	32 – 138
Na:K	32.7 (28-40.5)	33.3 (25.6-39)	0.6	29.7 (25-32)	29.6 (28-32.5)	0.78	>27
USG	1.02 (1.008-1.056)	1.02 (1.004-1.056)	1	1.03 (1.008-1.040)	1.03 (1.020-1.056)	1	1.020 -1.050
UP:C	0.81 (0.06-3.7)	0.28 (0.12-0.48)	1	0.63 (0-2.2)	0.5 (0-1.5)	0.6	<0.4

T0: time zero, T180: 180 days treatment, n: number of patients, Min: minimum, Max: maximum, *P*: significance probability, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine transaminase, TPP: total plasmatic protein, Na:K: sodium:potassium ratio, USG: urinary specific gravity, UP:C: urinary protein to creatinine ratio, \*: significantly different ( $p < 0,05$ ).

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados obtidos no presente estudo, a associação entre trilostano e selegilina demonstrou-se segura no tratamento do hiperadrenocorticismismo pituitário-dependente em cães. No entanto, apesar das tendências observadas nos efeitos do tratamento alternativo, não foram observados do ponto de vista de significância estatística menor elevação nos valores de ACTH endógeno, maior eficácia em reduzir os níveis de cortisol pós-ACTH ou menores dosagens médias de trilostano para o satisfatório controle do quadro clínico e hormonal. Foi constatada, contudo, menor adenomegalia em 180 dias de tratamento nos pacientes tratados com a associação trilostano e selegilina quando comparado ao uso isolado do trilostano, além de evidências de um melhor controle metabólico dos pacientes tratados com a associação das duas medicações. As questões cognitivas dos pacientes não sofreram alterações significativas ao longo do estudo, porém em alguns casos individuais observou-se melhora cognitiva em ambos os grupos. Não houveram maiores efeitos colaterais associados ou evidências de toxicidade devidos a este tratamento. O estudo não teve acesso a exames de neuroimagem como tomografia computadorizada ou ressonância magnética, que seriam de grande valia para melhor compreensão do comportamento do ACTH endógeno, bem como do aspecto hipofisário ao longo do tempo. Mais estudos com um maior número de pacientes, acompanhados por um maior período, podem ser elucidativos sobre os reais efeitos e benefícios deste protocolo médico no manejo clínico do hiperadrenocorticismismo pituitário-dependente em cães.



## REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, E.N. *et al* Comparasion of 2 doses for ACTH Simulation Testing in Dogs Suspected or Treated for Hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 30:1637-1641, 2016
- ALEXANDRAKI, K.I; GROSSMAN, A.B. Pituitary-targeted medical therapy of Cushing's Disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs** 17(5):669-677, 2008
- BEHREND, E.N. Canine hyperadrenocorticism In: **Canine and Feline Endocrinology** 4<sup>th</sup> ed. St Louis, Elsevier 669p. 2015.
- BEHREND, E.N. *et al*. Diagnosis of Spontaneous Canine Hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement (Small Animal). **J Vet Intern Med** 27: 1292-1304, 2012.
- BEHREND, E.N.; MELIÁN, C. Hyperadrenocorticism in dogs In: **Clinical Endocrinology of Companion Animals**. Ames, Wiley-Blackwell 445p. 2013.
- BRADDOCK, J.A. *et al*. Inneficacy of Selegiline in Treatment of Canine Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism. **Australian Veterinary Journal** 82:272-277, 2004
- BRADDOCK, J.A. Medical Treatment of Hyperadrenocorticism in the Dog. **Australian Veterinary Journal** 81:31-33, 2003
- BRUYETTE, D.S.; RUEHL, W.W; SMIDBERG, T.L. Canine Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism: a spontaneous animal model for neurodegenerative disorders and their treatment with L-Deprenyl. **Progress in Brain Research** 106:207-215, 1995
- BRUYETTE, D.S. *et al*. Management of Canine Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism with L-Deprenyl (Anipryl). **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 27:273-286, 1997

BURKHARDT, W.A. *et al.* Adrenocorticotrophic Hormone, but not Trilostane, causes severe Adrenal Hemorrhage, Vacuolization, and Apoptosis in Rats. **Domestic Animal Endocrinology** 40:155-164, 2011

BURKHARDT, W.A. *et al.* Evaluation of Baseline Cortisol, Endogenous ACTH, and Cortisol/ACTH Ratio to Monitor Trilostane Treatment in Dogs with Pituitary-Dependent Hypercortisolism **J Vet Intern Med** 27:919-923, 2013

CASTILLO, V.A. *et al.* Retinoic Acid as a Novel Treatment for Cushing's disease in Dogs. **Endocrinology** 147(9):4438-4444, 2006

CASTILLO, V.A. *et al.* Cushing's Disease in Dogs: Cabergoline Treatment **Research in Veterinary Science** 85:26-34, 2008

CASTILLO, V.A.; GALLELLI, M.F. Corticotroph adenoma in the dog: Pathogenesis and new therapeutic possibilities. **Research in Veterinary Science** 88:26-32, 2010

CASTILLO, V.A. *et al.* Effect of SOM320 (Pasireotide) on Corticotrophic Cells: Action in Dogs with Cushing's disease. **Neuroendocrinology** 94:124-136, 2011

CAVALCANTE, C.Z. *et al.* Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a pressão arterial sistêmica. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33(11):1357-1363, 2013

DE MARCO, V. *et al.* Ultrasonographic adrenal glands thickness measurement in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism in comparison with normal dogs matched by weight body. In: **Proceedings of the 2010 American College of Veterinary Internal Medicine Forum**, Anaheim: ACVIM, 2010. p.87-88. 2010. CD-ROM.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, W. Controlled Studies. In: **Veterinary Epidemiologic Research** 2<sup>nd</sup> ed. Charlottetown, VER Inc 865p. 2009

- DRAZNER, F.H. Making a Rational Choice in the Medical Management of Canine Hyperadrenocorticism. **Advances in Small Animal Medicine and Surgery** 19:Issue12 3p, 2006.
- ENGELKING, L.R. Hipotálamo e Hipófise. In: **Fisiologia Endócrina e Metabólica em Medicina Veterinária**. 2ª ed. São Paulo, Roca 184p. 2010
- FLESERIU, M; PETERSENN, R. New avenues in the medical treatment of Cushing's disease: corticotroph tumor targeted therapy. **Journal of Neuro-Oncology** 114(1):1-11, 2013
- FLESERIU, M: Medical treatment of Cushing disease – new targets, new hope. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America** 44(1):51-70, 2015
- GALAC, S. *et al.* Adrenals In: **Clinical Endocrinology of Dogs and Cats: An Illustrated Text** 2nd ed. Hannover, Schlütersche 338p. 2010.
- GALAC, S. *et al.* Effects of Trilostane on the Pituitary-Adrenocortical and Renin-Aldosterone in Dogs with Pituitary-Dependent Hypercortisolism. **The Veterinary Journal** 183:75-80 2010.
- GILOR, C; GRAVES, T.K. Interpretation of Laboratory Tests for canine Cushing's Syndrome. **Top Companion Anim Med** 26:98-108 2011.
- HERRTAGE, M.E.; RAMSEY, I.K. Canine hyperadrenocorticism In: **BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology** 4<sup>th</sup> ed. Quedgeley, BSAVA 292p. 2012
- HOFFMAN, K.L. Ultrasonographical Examination in Canine Hyperadrenocorticism. **Australian Veterinary Journal** 81:27-30, 2003
- JAVORSKY, B.R. *et al.* Hipotálamo e Glândula Hipofisária In: **Endocrinologia Básica e Clínica de Greenspan**. 9ª ed. Porto Alegre, Artmed 880p. 2013
- LABEUR, M *et al.* New aspects in the diagnosis and treatment of Cushing's disease. **Pituitary Today: Molecular, Physiological and Clinical aspects** 35(169-178), 2006
- LAU, D; RUTLEDGE, C; AGHI, M.K. Cushing's disease: current medical therapies and molecular insights guiding future therapies. **Neurosurgical Focus** 38(2):1-10, 2015

LOTTATI, M; BRUYETTE, D.S. Outcomes of the addition of Pasireotide to traditional adrenal-directed treatment for dogs with pituitary-dependent Hyperadrenocorticism secondary to macroadenoma: 9 cases (2013-2015). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 252(11):1403-1408, 2018

MANTIS, P *et al.* Changes in Ultrasonographic Appearance of Adrenal Glands in Dogs with Pituitary-Dependant Hyperadrenocorticism Treated with Trilostane. **Vet Radiol Ultrasound** 44:682-685, 2003

MARÇAL, MM *et al.* Avaliação do perfil clínico, diagnóstico e resposta ao tratamento médico em cães com hiperadrenocorticismo: 122 casos: 2007 a 2016. **Revista Clínica Veterinária** 131(Anais do 3º Congresso Brasileiro de Endocrinologia Veterinária):63, 2017

MARTINS, F.S.M *et al.* Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais do hiperadrenocorticismo em cães. **Revista Clínica Veterinária** 131(Anais do 3º Congresso Brasileiro de Endocrinologia Veterinária):79, 2017

MEDRONHO, R.A *et al* In: **Epidemiologia** 2ª ed. São Paulo, Atheneu 676p. 2008.

MICELI, D.D *et al.* Low dose of insulin detemir controls glycaemia, insulinemia and prevents diabetes mellitus in the dog with pituitary-dependent Hyperadrenocorticism. **Research in Veterinary Science** 91(1):114-120, 2012

MICELI, D.D; PIGNATARO, O.P; CASTILLO, V.A. Concurrent Hyperadrenocorticism and Diabetes Mellitus in Dogs. **Research in Veterinary Science** 115:425-431, 2017

MILGRAM, N.W *et a.l* Effects of Chronic Oral Administration of L-Deprenyl in the Dog. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 51:421-428, 1995

MILLS, D.; LEDGER, R. The Effects of Oral Selegiline Hydrochloride on Learning and Training in the Dog: a Psychobiological Interpretation. **Prog Neuro-Psychofarmacol & Biol Psychiat** 25:1597-1613, 2001

MUSCHNER, AC. *et al.* Adrenalectomia no tratamento do hiperadrenocorticismo secundário a tumores adrenocorticais funcionais em quatro cães. **Revista Clínica Veterinária** 131(Anais do 3º Congresso Brasileiro de Endocrinologia Veterinária):62, 2017

PETERSON, M.E. Medical Treatment of Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism in dogs: Should L-Deprenyl (Anypril) Ever Be Used? **J Vet Intern Med** 13:289-290 1999

PÖPPL, A.G *et al.* Prevalência e perfil da população afetada por endocrinopatias em um serviço de endocrinologia canina e felina no sul do Brasil: 1400 casos (2004-2014). **Acta Scientiae Veterinaria** 70: 251-259, 2016.

RAMSEY, I.K. Trilostane in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 40(2):269-283, 2010

REUSCH, C.E.; STEFFEN, T; HOERAUF, A. The efficacy of L-Deprenyl in Dogs with Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism. **J Vet Intern Med** 13:291-301, 1999

REUSCH, C.E. *et al.* Histological evaluation of the adrenal glands of seven dogs with Hyperadrenocorticism treated with trilostane. **The Veterinary Record** 160(7):219-224, 2007

RIJNBERK, A; BELSHAW, B.E. An alternative protocol for the medical management of canine pituitary-dependent Hyperadrenocorticism. **The Veterinary Record** 122(20):486-488, 1988

RUCKSTUHL, N.S.; NETT, C.S.; REUSCH, C.E. Results of Clinical Examinations, Laboratory Tests, and Ultrasonography in Dogs with Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism Treated with Trilostane. **Am J Vet Res** 63:506-512, 2012

RUEHL, W.W. *et al.* Therapeutic action of L-Deprenyl in dogs: A Model of Human Brain Aging. **Advances in Pharmacology** 45:316-319, 1998

RUEHL, W.W. *et al.* Treatment with L-Deprenyl Prolongs Life in Elderly Dogs. **Life Sciences** 61:1037-1044, 1997

SATO, A; HARA, Y. Protein expression of somatostatin receptor 2, somatostatin receptor 5 and dopamine D2 receptor in normal pituitary gland and ACTH-secreting pituitary adenomas in dogs.

**Research in Veterinary Science** 119:61-66, 2018

SIEBER-RUCKSTUHL, N.S. *et al.* Cortisol, aldosterone, cortisol precursor, androgen and endogenous ACTH concentrations in dogs with pituitary-dependent Hyperadrenocorticism treated with trilostane. **Domestic Animal Endocrinology** 31(1):63-75, 2006

SILVA, C.C. *et al.* Avaliação do grau de disfunção cognitiva em cães com hiperadrenocorticismo. **Revista Clínica Veterinária** 131(Anais do 3º Congresso Brasileiro de Endocrinologia Veterinária):32, 2017

STOHLMAN, A. Treating Cushing's Disease in Dogs. **FDA Consumer Health Information** 2p 2015 Disponível em: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm151209.htm>

TESHIMA, T. *et al.* Trilostane-induced Inhibition of Cortisol Secretion Results in Reduced Negative Feedback at the Pituitary-Hypothalamic Axis. **Domestic Animal Endocrinology** 36:32-44, 2009

TESHIMA, T. *et al.* Effects of Carbenoxolone Disodium on the Canine Pituitary-Adrenal Axis. **PLoS One** 10(8):1-11, 2015

TESHIMA, T. *et al.* Carbenoxolone Disodium Treatment for Canine Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism. **PLoS One** 11(11):1-10, 2016

XENOULIS, P; STEINER, J.M. Canine Hyperlipidaemia. **Journal of Small Animal Practice** 56:595-605, 2015

**ANEXO 1 - Termo de consentimento informado****UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Na sua cópia consta o telefone e endereço institucional do pesquisador principal, de modo que você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e a participação do seu cão, agora ou a qualquer momento. Em caso de recusa ou desistência você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo telefone (51) 3308 – 3738 ou pelo e-mail ceua@propeq.ufrgs.br.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

**Título do projeto:** Avaliação do efeito da associação entre selegilina e trilostano no tratamento do hiperadrenocorticismismo canino pituitário-dependente: ensaio clínico randomizado.

**Pesquisadores responsáveis:** **M.V. Alan Gomes Pöppl** – Prof. Dr. Departamento de Medicina Animal e Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **M.V. Guilherme Luiz Carvalho de Carvalho** – Aluno de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Endereço:** Av. Bento Gonçalves, 9090 – Agronomia, Porto Alegre/RS

CEP: 91540-000 **Telefone:** 51 3308-6112, 51 9922-2005 **E-mail:** carvalho.vet@gmail.com

Seu cão está sendo convidado para participar da pesquisa **“Avaliação do efeito da associação entre selegilina e trilostano no tratamento do hiperadrenocorticismismo canino pituitário-dependente: ensaio clínico randomizado”**

Seu cão foi selecionado e a participação do mesmo não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir e retirar seu consentimento para o seu cão fazer parte da pesquisa. Sua recusa não trará nenhum prejuízo na relação do seu animal com o pesquisador ou com a

instituição. O objetivo deste projeto é determinar, através de uma associação entre avaliações clínicas presenciais, exames laboratoriais de sangue, exames de imagem, e resposta a um questionário, se há diferença da resposta terapêutica dos pacientes a um tratamento associado entre duas medicações comparado ao tratamento convencional, e isto pode ser considerado um tratamento promissor para essa enfermidade, principalmente a médio-longo prazo.

O hiperadrenocorticismismo pituitário-dependente é hoje uma doença cada vez mais diagnosticada em cães atendidos no mundo inteiro. Sua origem é, na maioria das vezes, um processo neoplásico localizado em uma glândula na base do cérebro chamada hipófise que culmina em um excesso de produção de um hormônio chamado cortisol pelas glândulas adrenais. Quando não tratada ou bem controlada, essa condição pode trazer uma série de transtornos e injúrias a diversos sistemas orgânicos, destacando-se o sistema hepatobiliar, cardiovascular, respiratório e podendo culminar inclusive em *diabetes mellitus*.

Em humanos, o tratamento de eleição dessa condição é a remoção cirúrgica dessa massa em um procedimento chamado hipofisectomia. Em cães, não temos à disposição essa opção atualmente em quase todo território mundial, devido a um somatório de fatores associados a questões anestésico-cirúrgicas e de estrutura diagnóstica e hospitalar para manejo perioperatório, tornando essa realidade ainda distante. Como alternativa, preconiza-se o emprego de medicações que reduzam a produção de cortisol nas glândulas adrenais, sendo o trilostano a principal medicação para este fim. Este tratamento, apesar de se mostrar seguro e eficaz no controle dos níveis de cortisol e sinais clínicos da doença, quando utilizado continuamente, provoca algumas respostas compensatórias do corpo que podem demandar aumentos frequentes na dose diária da medicação, além da possibilidade de aparecimento de tumorações nas glândulas adrenais e crescimento da massa hipofisária.

Há uma boa carga de coerência em se avaliar a associação do trilostano à selegilina, uma medicação que além de poder controlar a origem do quadro na hipófise, pode trazer melhora na função cognitiva dos cães acometidos pelo hiperadrenocorticismismo.

A participação do seu cão nesta pesquisa consistirá em realização de avaliação clínica e colheita de exames para determinações laboratoriais e ultrassonografia abdominal em quatro momentos (dias zero, 30, 90 e 80). O primeiro quando diagnosticado positivo e os demais conforme a sequência cronológica de maneira prospectiva.

Não há riscos à saúde do seu cão relacionado com a participação na pesquisa, sendo todos os procedimentos realizados classificados de grau de severidade leve, conforme documentação



acessória fornecida pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA-UFRGS). Os benefícios relacionados com a participação do seu cão no presente projeto serão a realização sem custo das avaliações clínicas e de algumas determinações sanguíneas e estudos de ultrassonografia solicitadas pelo Serviço de Endocrinologia. Os únicos custos que você terá serão a do pagamento da medicação durante o tratamento, e das dosagens de cortisol durante o monitoramento (custos que você já teria se não participasse da pesquisa).

Todos os procedimentos serão realizados no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS por Médico Veterinário. Você terá a garantia de sigilo das informações obtidas bem como o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo.

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, CPF  
 \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tutor do canino da raça \_\_\_\_\_,  
 sexo \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_ denominado de  
 \_\_\_\_\_, ficha HCV \_\_\_\_\_, concordo em ceder  
 meu animal para participar do projeto “Avaliação do efeito da associação entre selegilina e trilostano no tratamento do hiperadrenocorticismismo canino pituitário-dependente: ensaio clínico randomizado”, bem como o registro fotográfico do mesmo.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da participação do meu cão e que fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador GUILHERME LUIZ CARVALHO DE CARVALHO sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento do meu animal.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_.

\_\_\_\_\_  
 Assinatura Tutor

\_\_\_\_\_  
 Assinatura Pesquisador

## Anexo 2: Questionário de avaliação da função cognitiva e comportamental

### “ANÁLISE DO PERFIL COMPORTAMENTAL DE CÃES COM HIPERADRENOCORTICISMO - RESPONSÁVEL”

Este instrumento faz parte de uma pesquisa de doutorado da Universidade Federal Fluminense (UFF/RJ) e tem por objetivo identificar os comportamentos observados em cães portadores de hiperadrenocorticismos e suas respectivas frequências:

1 Pergunta Geral - Você notou qualquer alteração no comportamento do seu cão nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

2 Personalidade do cão - Como você descreveria a personalidade de seu cão? Houve alguma mudança nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

3 Comportamento com membros da família - Você notou qualquer alteração em relação aos membros da família nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

4 Comportamento com estranhos em casa - Você notou qualquer alteração em relação a estranhos ou convidados em casa ou pessoas de fora, nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

5 Comportamento quando deixado sozinho - Você notou qualquer alteração no comportamento do seu cão quando ele /ela é deixada sozinha em casa, nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

6 Comportamento durante caminhadas - Você notou qualquer alteração no comportamento do seu cão durante os passeios nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

7 Medos e comportamentos de esquiva - Você notou qualquer mudança na intensidade do medo ou evitamento de pessoas, animais ou situações nos últimos 3 meses? Você pode descrever esta mudança?

8 Latidos - Você notou qualquer alteração na intensidade de latidos em geral, nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

9 Comer - Você notou qualquer mudança de comportamento em relação ao alimento nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

10 Beber - Você notou qualquer alteração relacionada com o consumo de água nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

11 Dormir - Você notou qualquer mudança no sono do seu cão nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

12 Comportamento com outros animais - Você notou qualquer alteração no comportamento em relação a outros cães ou outros animais nos últimos 3 meses? Você pode descrever essa mudança?

13 Problemas de comportamento - Você notou qualquer problema de comportamento que não era observado anteriormente? Você pode descrever essa mudança?

Adaptado de: CAVALCANTE, I.C.M. Análise do Perfil Comportamental de Cães com Hiperadrenocorticismo. **Projeto de Pesquisa Doutorado**. Universidade Federal Fluminense Niterói, 2014