

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

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE INDICADORES CARDIOVASCULARES,
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES
COM HIPERADRENOCORTICISMO ESPONTÂNEO**

Frederico Aécio Carvalho Soares

PORTO ALEGRE

2019

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

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE INDICADORES CARDIOVASCULARES,
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES
COM HIPERADRENOCORTICISMO ESPONTÂNEO**

Autor: Frederico Aécio Carvalho Soares

**Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias**

Orientador: Félix González

PORTO ALEGRE

2019

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

Soares, Frederico Aécio Carvalho
AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE INDICADORES
CARDIOVASCULARES, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM HIPERADRENOCORTICISMO
ESPONTÂNEO / Frederico Aécio Carvalho Soares. -- 2019.
97 f.
Orientador: Félix Hilário Díaz González.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Cardiologia. 2. Endocrinologia. 3. Clínica médica. 4. Patologia clínica. 5. Pequenos animais. I. González, Félix Hilário Díaz, orient. II. Título.

Frederico Aécio Carvalho Soares

AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE INDICADORES CARDIOVASCULARES,
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM
HIPERADRENOCORTICISMO ESPONTÂNEO

Aprovada em 14 MAR 2019

APROVADO POR:

Prof. Dr. Félix Hilário Díaz González (UFRGS)

Orientador e Presidente da Comissão

Profª. Dra. Mariana Cristina Hoepfner Rondelli (UFPEL)

Membro da Comissão

Prof. Dr. Alan Gomes Pöppel (UFRGS)

Membro da Comissão

Prof. Dr. Daniel Guimarães Gerardi (UFRGS)

Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha sobrinha Maria Fernanda, que assistiu minha defesa de mestrado do ventre da minha querida irmã e se desenvolveu graciosamente durante o projeto de doutorado. Dedico também ao meu recém-chegado sobrinho Bento, torcendo para o que o estudo e a pesquisa sejam valorizados pelas próximas gerações.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família, pessoas maravilhosas que tenho o privilégio de ter sempre ao meu lado. Paulo Roberto, Maria da Graça, Pablito, Nicole, Bebel e Fernando: muito obrigado!

À minha namorada Mariana, uma pessoa especial que entrou na minha vida no final do doutorado, mas tornou os dias de trabalho na tese mais leves e agradáveis.

Ao Professor Félix González, pelas oportunidades de orientação desde a época de iniciação científica e, posteriormente, no mestrado e doutorado, estando sempre disposto a auxiliar e fazer pesquisas em diferentes áreas. Acima de tudo, agradeço ao Professor Félix pelo incentivo à carreira docente que, graças ao seu apoio, consegui conciliar com o doutorado.

Ao Professor Alan Pöppel e aos médicos veterinários do serviço de endocrinologia, Guilherme Carvalho, Tatiane Linden, Sávio Francisco e Letícia Machado, pela amizade e parceria acadêmica, compartilhando e atendendo os pacientes com hiperadrenocorticismo que participaram do projeto.

Aos professores, veterinários, funcionários e estagiários do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias e do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho. Ambientes estes que, ao longo dos últimos anos, foram para mim fontes de um aprendizado imensurável.

Ao Professor Néelson Kretzmann Filho e a equipe do Reprolab UFRGS, pela amizade e auxílio na realização das análises laboratoriais de estresse oxidativo.

Aos colegas professores e alunos do Centro Universitário Ritter dos Reis – UniRitter, onde nos últimos anos tenho vivenciado a mais desafiadora e enriquecedora experiência profissional. Uma menção especial à professora Viviane Guyoti, profissional que admiro e responsável por esta primeira oportunidade na carreira docente.

A todos os demais colegas e professores que contribuíram durante a minha formação acadêmica.

Aos tutores dos cães que participaram do projeto, que foram extremamente solícitos e acessíveis, entendendo que o intuito dos estudos é produzir informações científicas que ajudem outros pacientes no futuro.

Por fim, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, minha casa de estudos nos últimos 14 anos. Para sempre terei orgulho de levar o tempo que permaneci nesta casa no meu currículo, nas minhas memórias e no meu coração.

EPÍGRAFE

“Quando nos afastamos da ciência, porque ela parece difícil demais, abrimos mão da capacidade de cuidar do nosso futuro. Ficamos privados dos direitos civis. A nossa autoconfiança se deteriora. Mas quando ultrapassamos essa barreira, quando as descobertas e os métodos se tornam claros para nós, quando compreendemos e empregamos esse conhecimento, sentimos uma profunda satisfação.”

Carl Sagan

RESUMO

O hiperadrenocorticismo (HAC) é uma das endocrinopatias mais comumente atendidas na rotina clínica de cães. O hipercortisolismo pode causar alterações multissistêmicas e o acompanhamento de parâmetros clínicos e laboratoriais, além do controle de comorbidades, são importantes para uma abordagem terapêutica ideal. Dentre as complicações sistêmicas que afetam o sistema cardiovascular, destacam-se a hipertensão arterial e a hipertrofia miocárdica, no entanto, a fisiopatologia destas alterações ainda não é totalmente esclarecida. Este estudo prospectivo gerou dois artigos e teve como principal objetivo avaliar parâmetros cardiovasculares, hematológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em cães com HAC espontâneo. Além de investigar a correlação do estresse oxidativo aos achados cardiovasculares, o estudo visou ainda avaliar a influência dos parâmetros analisados e da presença da degeneração valvar mitral (DVM) como comorbidade no prognóstico e expectativa de vida dos pacientes. Durante o estudo, foram avaliados 25 cães doentes, divididos em um grupo de 16 pacientes com HAC e outro grupo com nove pacientes com HAC e DVM concomitante. Os pacientes foram avaliados em três momentos, a partir do diagnóstico de HAC, e acompanhados por um período de até 766 dias. Além dos cães com HAC, um grupo controle com 20 cães com perfil demográfico semelhante foi recrutado por conveniência e submetido aos mesmos exames. Todos os cães foram submetidos à coleta de sangue (para avaliação de parâmetros laboratoriais), aferição da pressão arterial, eletrocardiografia e ecocardiografia. Os resultados analisados sugerem que existe aumento do estresse oxidativo no HAC canino, evidenciado pela presença de peroxidação lipídica no momento do diagnóstico, porém, o tratamento clínico com trilostano é eficiente para controlar esta alteração. Não houve evidências de correlação entre a peroxidação lipídica e a pressão arterial sistólica, no entanto, é sugerido que o estresse oxidativo tem correlação positiva com o tamanho do átrio esquerdo. Ainda, é possível concluir que fatores como idade avançada e presença de dispneia no momento do

diagnóstico estão associados ao pior prognóstico. Foi possível também verificar que a degeneração valvar mitral é uma comorbidade comum em cães com HAC, o que reforça a importância da avaliação cardiovascular destes pacientes, principalmente daqueles de pequeno porte e idade avançada.

Palavras-chave: ecocardiograma, endocardiose, peroxidação lipídica, pressão arterial, síndrome de Cushing.

ABSTRACT

Hyperadrenocorticism (HAC) is one of the most common endocrinopathies in canine clinical routine. Hypercortisolism can cause multisystemic alterations and the monitoring of clinical and laboratory parameters, as well as the control of comorbidities, are important for an optimal therapeutic approach. Among the systemic complications that affect the cardiovascular system, hypertension and myocardial hypertrophy can be highlighted, however, the pathophysiology of these alterations is unclear. This prospective study generated two articles and had as main objective to evaluate cardiovascular, hematological, biochemical, and oxidative stress parameters in dogs with spontaneous hyperadrenocorticism. In addition, aim to investigate the correlation of oxidative stress with cardiovascular features, and to evaluate the influence of the analyzed parameters and of the presence of mitral valve degeneration (MVD) as a comorbidity in the prognosis and life expectancy of the patients. During the study, 25 dogs were divided into a group of 16 patients with HAC and another group with nine patients with concomitant HAC and MVD. The patients were evaluated at three different time points, from the HAC diagnosis, and followed up for a period of up to 766 days. In addition to HAC dogs, a control group with 20 dogs with similar demographic profile was recruited for convenience and submitted to the same tests. All dogs were submitted to blood collection (for laboratory tests), blood pressure measurement, electrocardiography, and echocardiography. The results analyzed suggest that there is increased oxidative stress in canine HAC, evidenced by the presence of lipid peroxidation at the time of diagnosis, however, the clinical treatment with trilostane is efficient to control this alteration. There was no evidence of a correlation between lipid peroxidation and systolic blood pressure, however, it is suggested that oxidative stress is correlated to the size of the left atrium. Moreover, it is possible to conclude that factors such as advanced age and presence of dyspnea at the time of diagnosis are associated with a worse prognosis. It was also possible to verify that mitral valve degeneration is a

common comorbidity in dogs with HAC, which reinforces the importance of the cardiovascular evaluation of these patients, especially those of small size and advanced age.

Keywords: echocardiogram, endocardiosis, lipid peroxidation, blood pressure, Cushing's syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - Representação gráfica do controle funcional do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal..... 15
- Figura 2** - Gráfico representando o teste de supressão com baixa dose de dexametasona em cães..... 17
- Figura 3** - Gráfico representando o teste de estimulação com ACTH em cães..... 18
- Figura 4** - Imagem representando a reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído..... 19

ARTIGO 1

- Figura 1** - Mensuração de TBARS (MDA/mg de proteína) no grupo HAC no momento do diagnóstico e no grupo controle na primeira avaliação..... 36
- Figura 2** - Mensuração de TBARS (MAD/mg de proteína) em cães com HAC na primeira avaliação (diagnóstico), segunda avaliação (seis meses após início de tratamento) e terceira avaliação (12 meses após início de tratamento) 37

ARTIGO 2

- Figura 1** - Curva de sobrevivência de cães do grupo HAC comparados ao grupo HAC + DVM..... 66

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Características demográficas da população de cães avaliada.....	33
Tabela 2 - Correlações de Pearson (r) e valor de probabilidade (P) da concentração de TBARS com parâmetros laboratoriais em cães com hiperadrenocorticismo.....	34
Tabela 3 - Correlações de Pearson (r) e valor de probabilidade (P) da concentração de TBARS com parâmetros cardiovasculares no grupo HAC no momento diagnóstico.....	35

ARTIGO 2

Tabela 1 - Parâmetros laboratoriais (média \pm desvio padrão ou mediana e percentil) de cães com hiperadrenocorticismo (grupo HAC) no momento do diagnóstico e cães saudáveis (Grupo Controle)	60
Tabela 2 - Parâmetros cardiovasculares (média \pm desvio padrão) de cães com hiperadrenocorticismo (grupo HAC) no momento do diagnóstico e cães saudáveis (Grupo Controle).....	61
Tabela 3 - Parâmetros laboratoriais (média \pm desvio padrão) de cães do grupo HAC durante o tempo de acompanhamento.....	62
Tabela 4 - Parâmetros cardiovasculares (média \pm desvio padrão) de cães do grupo HAC durante o tempo de acompanhamento.....	63
Tabela 5 - Parâmetros laboratoriais (média \pm desvio padrão) dos cães do grupo HAC, comparando os pacientes que permaneceram vivos e os pacientes que morreram até o final do tempo de acompanhamento.....	64
Tabela 6 - Parâmetros cardiovasculares (média \pm desvio padrão) dos cães do grupo HAC, comparando os pacientes que permaneceram vivos e os pacientes que morreram até o final do tempo de acompanhamento.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AE	Átrio esquerdo
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
Ao	Diâmetro de artéria aorta
bpm	Batimentos por minuto
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DVEd	Cavidade do ventrículo esquerdo em diástole
DVEs	Cavidade do ventrículo esquerdo em sístole
DVM	Degeneração valvar mitral
EDTA-K2	Etilenodiaminotetracético dipotássico
FA	Fosfatase alcalina
FLAo	Fluxo aórtico
FLP	Fluxo pulmonar
GEE	Equações estimativas generalizadas
GC	Grupo controle
HAC	Hiperadrenocorticismo
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
MDA	Malondialdeído
PAS	Pressão arterial sistêmica
PDH	Hiperadrenocorticismo pituitário-dependente
PLVE	Parede livre do ventrículo esquerdo
RL	Radicais livres
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SIV	Septo interventricular
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TAF	Tumor adrenal funcional
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
TSBDD	Teste de supressão com baixa dose de dexametasona
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	Etiologia e predisposição do hiperadrenocorticismismo canino	14
3.2	Diagnóstico do hiperadrenocorticismismo canino	16
3.3	Estresse oxidativo	18
3.4	Impacto cardiovascular do hiperadrenocorticismismo canino	20
3.5	Comorbidades	21
3.6	Tratamento do hiperadrenocorticismismo canino	21
3.7	Prognóstico no hiperadrenocorticismismo canino	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Artigo 1: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em cães com hiperadrenocorticismismo espontâneo	23
4.2	Artigo 2: Avaliação prospectiva de indicadores cardiovasculares e laboratoriais em cães com hiperadrenocorticismismo espontâneo	50
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS	84
	ANEXO A – Carta de aprovação da CEUA/UFRGS	88
	ANEXO B – Carta de autorização do HCV/UFRGS	89
	ANEXO C – Termo de consentimento dos tutores	90
	ANEXO D – Ficha de atendimento dos pacientes	92

1 INTRODUÇÃO

O hiperadrenocorticismo (HAC) é uma das endocrinopatias mais comumente atendidas na rotina médica de cães. De acordo com o Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, esta foi a doença de maior ocorrência (37%) em cães no período de 2004 a 2014 (PÖPPL *et al.*, 2016). A doença ocorre geralmente em cães de meia-idade a idosos e de pequeno porte, sendo o Poodle, Dachshund e Yorkshire terrier algumas das raças mais predispostas (GONZÁLEZ *et al.*, 2014, NELSON, 2015). Tal grupo de risco é o mesmo para outras doenças, como a degeneração valvar mitral (DVM). A média de sobrevida em cães com HAC submetidos a tratamento é de 14 a 30 meses (BARKER *et al.*, 2005; HELM *et al.*, 2011; ARENAS *et al.*, 2014; NELSON, 2015), sendo que o acompanhamento de parâmetros clínicos e laboratoriais, além do controle de comorbidades estão entre os fatores associados ao tempo de sobrevida.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um achado comum no HAC canino (ORTEGA *et al.*, 1996; HURLEY; VADEN, 1998; GOY-THOLLOT *et al.*, 2002; NOVELLAS *et al.*, 2008; FRACASSI *et al.*, 2014; SOARES, 2015). Outro possível achado em cães com HAC é o remodelamento miocárdico, caracterizado por hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo (CHEN *et al.*, 2014; SOARES, 2015; TAKANO *et al.*, 2015). Porém, não há uma correlação entre este remodelamento e a presença de HAS, assim, a fisiopatologia destes eventos não está totalmente esclarecida. Em humanos, os radicais livres provenientes do estresse oxidativo atuam como mensageiros intracelulares e intercelulares levando a um remodelamento miocárdico (BYRNE *et al.*, 2003). Contudo, a possibilidade de envolvimento do estresse oxidativo no remodelamento cardíaco ainda não foi investigada em cães com HAC. Um estudo recente em medicina humana demonstrou que, entre outros fatores, o aumento do estresse oxidativo está relacionado ao aumento do risco de eventos cardiovasculares no HAC, sugerindo que estas alterações podem contribuir com a mortalidade dos pacientes com a doença (KARAMOUZIS *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar parâmetros cardiovasculares, hematológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em cães com hiperadrenocorticismo espontâneo no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento.

2.2 Objetivos específicos

- Mensurar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como parâmetro de estresse oxidativo em cães com HAC no momento do diagnóstico e após o tratamento clínico.
- Investigar a hipótese de o estresse oxidativo ter correlação com parâmetros hematológicos, bioquímicos e cardiovasculares em cães com HAC.
- Avaliar e monitorar parâmetros cardiovasculares, hematológicos e bioquímicos em cães com hiperadrenocorticismo, visando definir possíveis alterações correlacionadas com menor tempo de sobrevida na doença.
- Avaliar a possível influência da degeneração valvar mitral como comorbidade na sobrevida de cães com HAC.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Etiologia e predisposição do hiperadrenocorticismismo canino

O HAC, também conhecido como Síndrome de Cushing, é uma doença caracterizada por uma variedade de sinais clínicos e anormalidades multissistêmicas resultantes da exposição crônica ao excesso de corticoides (BEHREND, 2015; NELSON, 2015). A secreção de cortisol pelas glândulas adrenais é regulada através do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (Figura 1), envolvendo a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela pituitária, e mecanismos de *feedback* negativo. O HAC canino de ocorrência espontânea pode ser classificado como: ACTH-dependente, também chamado hiperadrenocorticismismo pituitário-dependente (PDH), que geralmente está associado a adenomas de pituitária e corresponde a 80-85% dos casos; ou ACTH-independente, quando o hipercortisolismo é resultante de tumores adrenocorticais funcionais (TAF) primários, que correspondem a 15-20% dos casos. A doença também pode ser de origem iatrogênica, causada pela administração exógena de corticosteroides (BEHREND, 2015; NELSON, 2015).

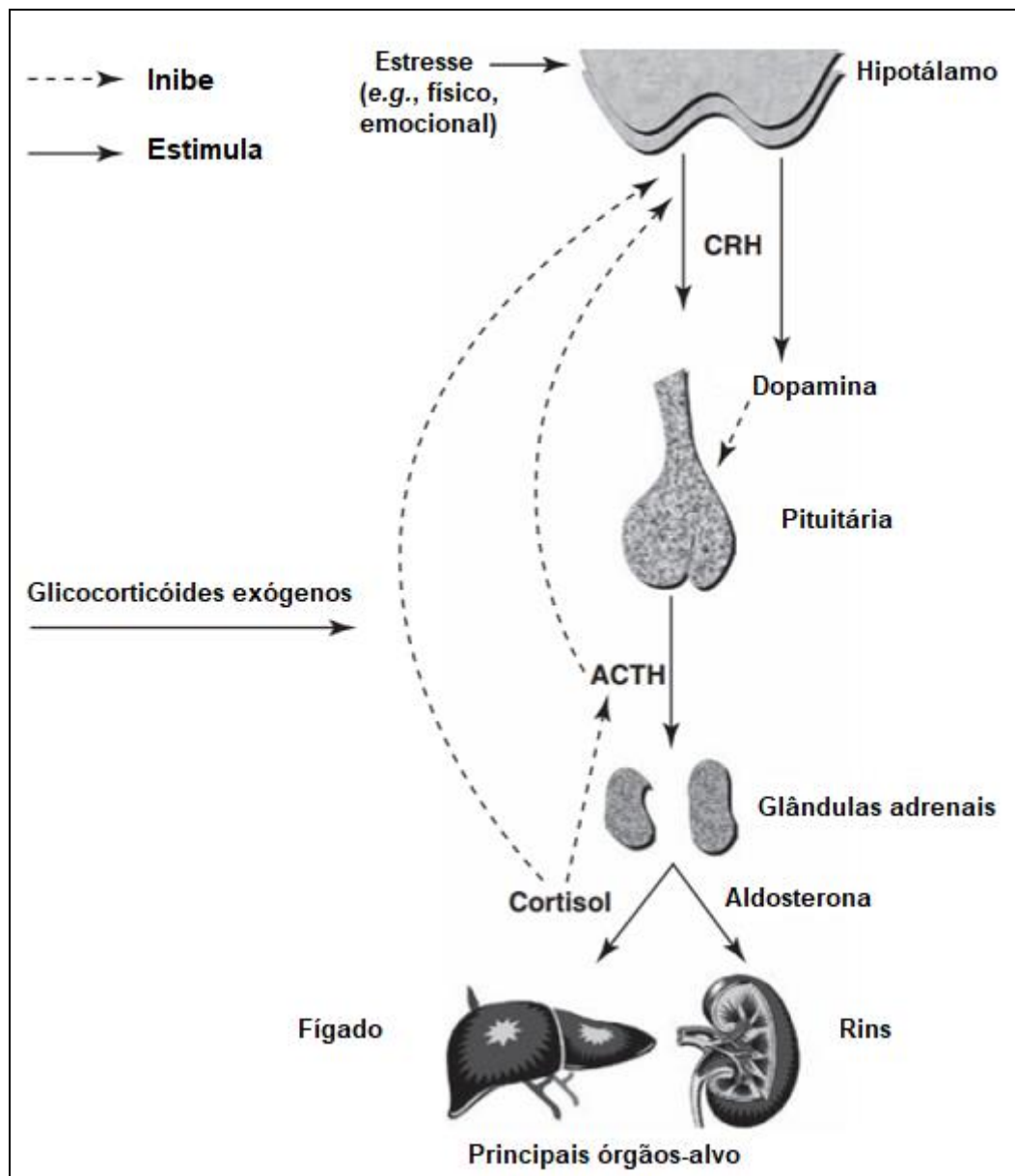


Figura 1. Representação gráfica do controle funcional do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal. Fonte: Behrend (2015).

O HAC acomete principalmente cães de raças pequenas, como Poodle, Dachshund e Yorkshire terrier. A doença afeta animais de meia idade a idosos, geralmente acima dos 6 anos e, em média, com 10 anos de idade (GONZÁLEZ *et al.*, 2014; BEHREND, 2015; NELSON, 2015; PÖPPL *et al.*, 2016; HOFFMAN *et al.*, 2018; MARTINS, 2018). Um estudo ainda evidenciou que, à medida que a idade avança, o risco de HAC aumenta em cães (O'NEILL *et al.*, 2016). Apesar de não haver comprovação de predisposição sexual, a

doença é mais documentada em fêmeas (BEHREND, 2015; NELSON, 2015; PÖPPL *et al.*, 2016; HOFFMAN *et al.*, 2018) e dois recentes estudos sugeriram que a castração aumenta o risco de HAC (BOCK; PÖPPL, 2018; HOFFMAN *et al.*, 2018).

3.2 Diagnóstico do hiperadrenocorticismismo canino

O diagnóstico de HAC é baseado em uma série de informações, incluindo o histórico médico, os sinais clínicos, o exame físico, exames de imagem e exames laboratoriais. Os sinais clínicos mais comumente observados são poliúria, polidipsia, polifagia, ofego/dispneia, distensão abdominal, alopecia, fraqueza muscular e perda de massa muscular (BEHREND, 2015; NELSON, 2015; MARTINS, 2018).

Na triagem laboratorial por meio de análises hematológica, bioquímica e urinária, são achados comuns: leucocitose, neutrofilia, linfopenia, eosinopenia, trombocitose, eritrocitose, aumento da atividade de alanina aminotransferase (ALT), aumento da atividade de fosfatase alcalina (FA), hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, diminuição de ureia e creatinina, hiperglicemia, proteinúria e densidade urinária inferior a 1,020 (BEHREND, 2015; NELSON, 2015).

A ultrassonografia abdominal é útil principalmente para avaliar o tamanho e o formato das glândulas adrenais. No PDH, costuma ser visualizada hiperplasia bilateral de glândulas adrenais (BEHREND, 2015; NELSON, 2015). As medidas adrenais podem variar de acordo com o porte do paciente (DOUGLASS *et al.*, 1997; MOGICATO *et al.*, 2011) e um estudo recente sugeriu um ponto de corte de 6,0 mm de largura para diferenciar uma glândula adrenal normal de uma hiperplásica em cães de pequeno porte (CHOI *et al.*, 2011). Nos casos de HAC por TAF, a imagem é caracterizada por uma massa adrenal geralmente unilateral, com destruição da arquitetura tecidual normal e possível atrofia da glândula contralateral (BEHREND, 2015; NELSON, 2015). A tomografia computadorizada pode ser um exame de imagem bastante útil para avaliação adrenal e, principalmente, pituitária, no entanto, este exame ainda não faz parte da rotina em muitos locais de atendimento.

A partir da suspeita clínica de HAC, embasada por sinais clínicos, achados laboratoriais e de diagnóstico por imagem mencionados, o diagnóstico deve ser confirmado a partir de testes endócrinos. Os principais testes utilizados na rotina clínica são o teste de

supressão com baixa dose de dexametasona (TSBDD) (Figura 2) e o teste de estimulação com ACTH (Figura 3). Além da definição do diagnóstico de HAC, o resultado do TSBDD, associado aos exames de diagnóstico por imagem, é uma ferramenta utilizada para diferenciar o PDH do HAC por TA (BEHREND, 2015; NELSON, 2015).

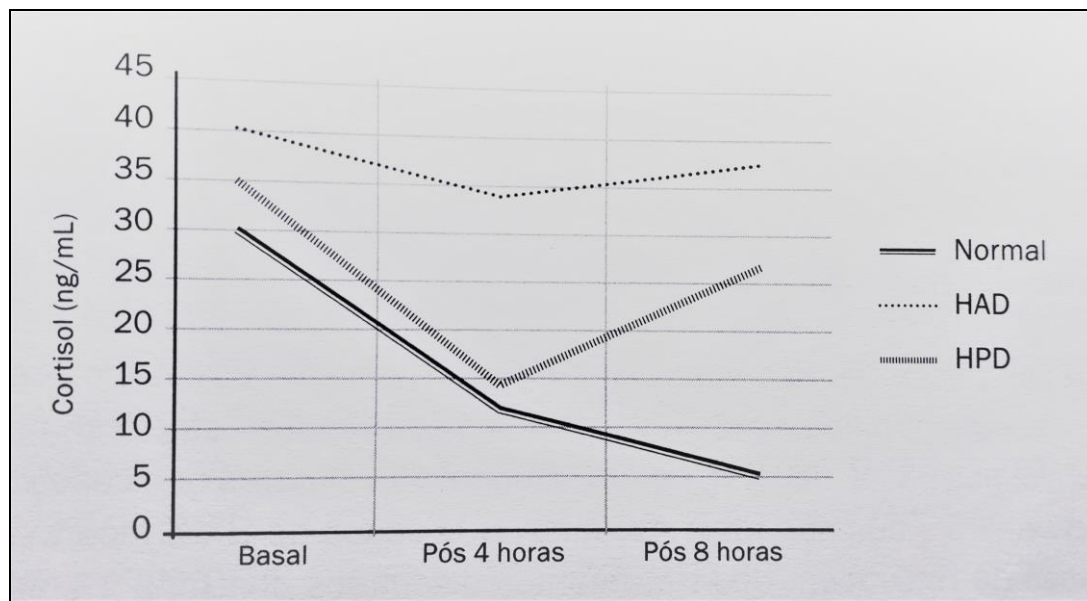


Figura 2. Gráfico representando o teste de supressão com baixa dose de dexametasona em cães (HAD: hiperadrenocorticismo adrenal-dependente; HPD: hiperadrenocorticismo pituitário-dependente). Fonte: González et al. (2014).

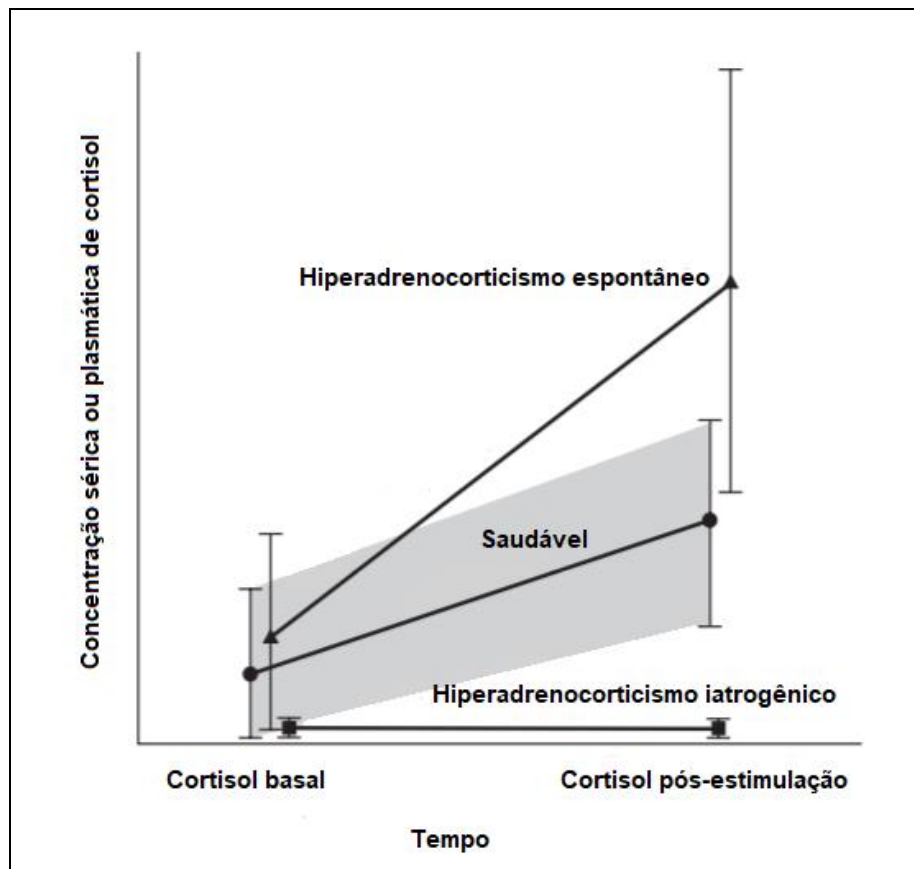


Figura 3. Gráfico representando o teste de estimulação com ACTH em cães. Fonte: Behrend (2015).

3.3 Estresse oxidativo

Os radicais livres (RL) são produzidos permanentemente no organismo via metabolismo celular, sendo regulados fisiologicamente por enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase). Em caso de produção excessiva, os RL acabam induzindo dano celular e caracterizam o fenômeno chamado de estresse oxidativo. Os ácidos graxos dos fosfolípidos das membranas celulares são as primeiras moléculas lesadas pelos RL, através de uma peroxidação lipídica que altera a estabilidade e a permeabilidade da membrana (SAGOLS; PRIYMENKO, 2011). Uma maneira de mensurar a peroxidação lipídica é através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo que um dos principais métodos é através da reação do malondialdeído

com o ácido tiobarbitúrico (Figura 4), que forma um complexo que pode ser quantificado por espectrofotometria (DRAPER ET AL., 1993).

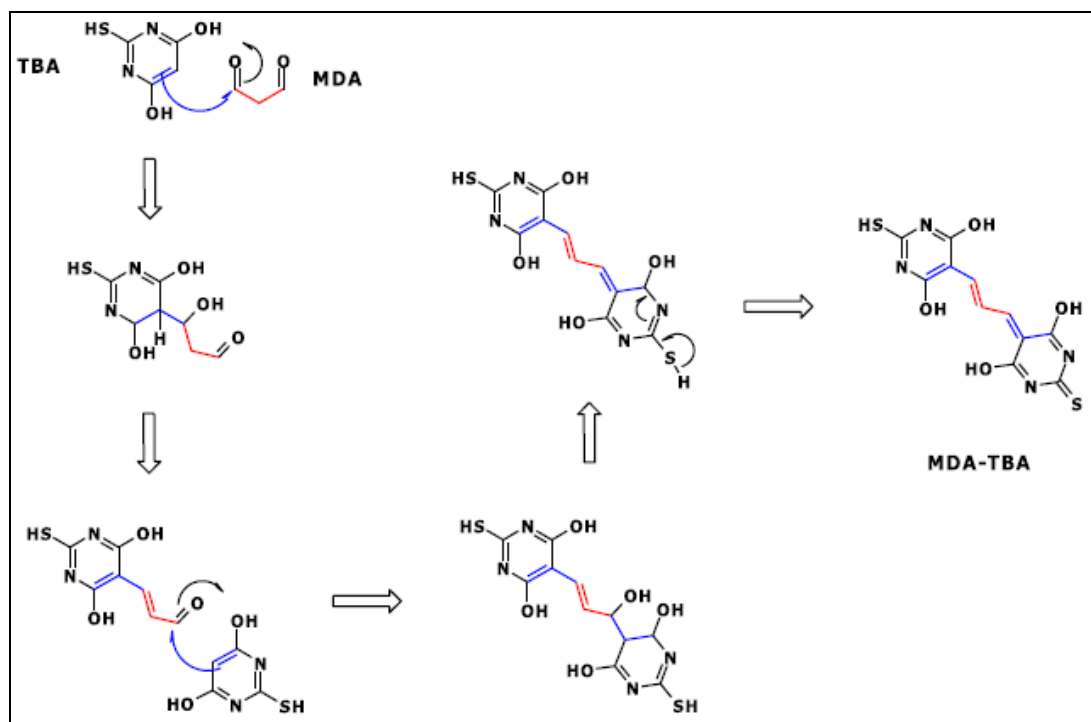


Figura 4. Imagem representando a reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdeído (MDA). Fonte: Tsikas (2017).

Recentemente, a peroxidação lipídica e as enzimas antioxidantes têm sido utilizadas para avaliar o estresse oxidativo em cães com diversas afecções, como, por exemplo, rangeliose (FRANÇA *et al.*, 2012), ehrlichiose (Da Silva *et al.*, 2013), cinomose (CURTIS, 2013), neoplasia mamária (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2013), doença renal crônica (KOGIKA *et al.*, 2015), linfoma multicêntrico (BOTTARI *et al.*, 2015), doença inflamatória intestinal (RUBIO *et al.*, 2017) e insuficiência cardíaca por degeneração valvar mitral ou cardiomiopatia dilatada (VERK *et al.*, 2017).

O papel do estresse oxidativo nos eventos cardiovasculares é um tema explorado em diversas pesquisas nos últimos anos. Trabalhos sugerem uma associação do processo de estresse oxidativo com a hipertensão arterial em humanos, envolvendo peroxidação lipídica, disfunção endotelial e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (VIRDIS *et al.*, 2013; MONTEZANO *et al.*, 2015; YAVUZER *et al.*, 2016; PAWLUK *et al.*, 2017).

Em relação a alterações cardíacas estruturais, os radicais livres podem causar apoptose celular (HARE, 2001) e agir como mensageiros intracelulares levando ao remodelamento miocárdico (BYRNE *et al.*, 2003) e aumento atrial (CHEN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2017). Em relação às atividades elétrica e mecânica do coração, os estudos também sugerem envolvimento do estresse oxidativo, respectivamente, nas arritmias atriais (LI *et al.*, 2017) e na disfunção sistólica (BYRNE *et al.*, 2003).

3.4 Impacto cardiovascular do hiperadrenocorticismismo canino

Em cães, relatos evidenciam que 59 a 86% dos pacientes com HAC apresentam hipertensão arterial (ORTEGA *et al.*, 1996; HURLEY; VADEN, 1998; GOY-THOLLOT *et al.*, 2002; NOVELLAS *et al.*, 2008; SOARES, 2015). Embora não esteja totalmente elucidado de que forma o hipercortisolismo leva à hipertensão arterial sistêmica, diferentes mecanismos são descritos: os efeitos mineralocorticoides do cortisol, a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a maior síntese de angiotensinogênio, a ação do cortisol no endotélio da vasculatura periférica e a sensibilização de catecolaminas (FRASER *et al.*, 1989; MAGIAKOU *et al.*, 2006). O SRAA é um sistema enzimático-peptídico que ocorre tanto na circulação como nos tecidos e é responsável por potente mecanismo vasoconstritor dentre outros efeitos. A angiotensina II (principal peptídeo ativo do sistema) atua nos receptores AT2 e, principalmente, no receptor AT1, encontrado em músculo liso vascular, fígado, rins, coração, pulmões, córtex da adrenal, pituitária e cérebro (BORGHERESI, 2006).

Recentes estudos ecocardiográficos evidenciaram o impacto que o HAC pode causar na estrutura e função cardíaca de cães. As alterações encontradas, assim como ocorre nos humanos com a doença, estão relacionadas principalmente ao ventrículo esquerdo e são caracterizadas por disfunção diastólica, espessamento do septo interventricular e da parede livre do ventrículo esquerdo (CHEN *et al.*, 2014; OUI *et al.*, 2015; TAKANO *et al.*, 2015), podendo inclusive estar correlacionadas à liberação de troponina I na circulação (SOARES *et al.*, 2016).

Acreditava-se que esse remodelamento cardíaco seria simplesmente uma consequência decorrente da HAS, afinal, o coração é um dos órgãos-alvo lesionados quando desafiado por uma hipertensão contínua (ACIERNO *et al.*, 2018). Porém, as

pesquisas não encontram uma correlação direta entre hipertrofia cardíaca e HAS no HAC, assim, a fisiopatologia do desenvolvimento desse remodelamento miocárdico ainda não está totalmente esclarecida. Mecanismos como a ação direta do cortisol nos cardiomiócitos, a presença de estresse oxidativo e a ativação de alguns componentes do SRAA podem estar envolvidos (BYRNE *et al.*, 2003; CONNELL *et al.*, 2008; AINSCOUGH *et al.*, 2009). Em humanos, foi evidenciado que o remodelamento cardíaco está associado à ocorrência do processo de fibrose do músculo cardíaco (YIU *et al.*, 2012).

3.5 Comorbidades

O perfil epidemiológico do HAC, caracterizado por cães de pequeno porte com idade média a avançada, é também o mesmo grupo de risco para diversas outras doenças. De acordo com o Hospital de Clínicas Veterinárias do Rio Grande do Sul, 6,2% dos pacientes com endocrinopatias foram diagnosticados com HAC e diabetes mellitus concomitantes (PÖPPL *et al.*, 2016). Miceli *et al.* (2017) concluíram ainda que o desenvolvimento de diabetes mellitus reduz a sobrevida em cães com HAC. Outro estudo retrospectivo apontou, além da diabetes mellitus, infecção de trato urinário, urolitíase, hipertensão, mucocele de vesícula biliar e doença tromboembólica como comorbidades comuns no HAC (HOFFMAN *et al.*, 2018). Ainda, em um estudo que avaliou a função cardiocirculatória de cães com HAC, diabetes mellitus e degeneração valvar mitral foram as principais comorbidades que causaram exclusão de pacientes (SOARES, 2015).

3.6 Tratamento do hiperadrenocorticismismo canino

A meta no tratamento do HAC é atingir o normocortisolismo, eliminando tanto a fonte de ACTH quanto de cortisol autônomo em excesso e visando eliminar sinais clínicos, prevenir complicações, melhorar a sobrevida e a qualidade de vida (SANDERS *et al.*, 2018). Existem opções cirúrgicas de tratamento: a adrenalectomia no caso do HAC por TAF (JIMÉNEZ PELÁEZ *et al.*, 2008; NELSON, 2015; SANDERS *et al.*, 2018); e a hipofisectomia nos casos de PDH (HANSON *et al.*, 2005; NELSON, 2015; SANDERS *et al.*, 2018). Ainda no caso de PDH, a radioterapia tem sido aplicada como opção terapêutica (HANSEN *et al.*, 2018), no entanto, esta técnica está disponível em poucos centros na rotina veterinária brasileira no presente momento. Contudo, devido aos aspectos financeiros

e riscos que estes procedimentos envolvem, grande parte dos tutores opta por um tratamento farmacológico para a doença. É importante que o tutor do cão esteja ciente de que o tratamento medicamentoso não é curativo.

Atualmente, os fármacos mais comumente utilizados para o tratamento medicamentoso do HAC são o mitotano e o trilostano. O mitotano é um agente citotóxico responsável pela destruição das células do córtex adrenal; e o trilostano, um inibidor da enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase, a qual está envolvida na síntese de cortisol pelo córtex adrenal (PAPICH, 2009). O trilostano é o fármaco de escolha para cães com PDH e, nos casos de HAC por TAF, tanto o trilostano quanto o mitotano podem ser utilizados (SANDERS *et al.*, 2018).

O trilostano tem uma eficácia de aproximadamente 80% e pode controlar os efeitos do HAC em cães por prolongados períodos de tempo (NELSON, 2015). Além disso, apresenta como vantagem uma menor incidência de efeitos adversos quando comparado ao mitotano (REINE, 2007). Apesar do bom controle clínico da doença, complicações como hipertensão arterial, hipercoagulabilidade e proteinúria devem ser monitoradas, pois podem persistir mesmo com o tratamento (LEMETAYER; BLOIS, 2018).

A dosagem inicial de trilostano recomendada atualmente é de 0,5 a 1,0 mg/kg a cada 12 horas (BEHREND, 2015; NELSON, 2015; SANDERS *et al.*, 2018). Apesar de ser um fármaco seguro, quanto maior a dose administrada, maior o risco de o paciente desenvolver hipoadrenocorticismos iatrogênicos, assim, é importante que o tutor seja orientado a como reconhecer os sinais desta crise (KING; MORTON, 2017). Para a monitoração do tratamento, o recomendado é realizar um teste de estimulação com ACTH entre 10 e 14 dias após o início da medicação, caso os sinais clínicos estejam presentes, ou após 30 dias se os sinais clínicos estiverem controlados, repetindo o teste periodicamente a cada 3-6 meses (BEHREND, 2015; NELSON, 2015; LEMETAYER; BLOIS, 2018).

3.7 Prognóstico no hiperadrenocorticismos canino

Como a maioria dos cães com HAC acaba sendo submetida a um tratamento farmacológico para a redução da hiperfunção adrenal e dos sinais consequentes da hipercolesterolemia, sem uma cura clínica da doença, estudos de avaliação prognóstica se tornam importantes para a monitoração do paciente. O prognóstico e o tempo de sobrevivida

dependem de diversos fatores, como a idade, o estado de saúde geral, o comprometimento do tutor no tratamento e o desenvolvimento de possíveis complicações da doença (NELSON, 2015).

A sobrevida média em cães com HAC espontâneos submetidos a tratamento medicamentoso varia de 14 a 30 meses (ARENAS *et al.*, 2014; GONZÁLEZ *et al.*, 2014; NELSON, 2015), sendo que não é evidenciada diferença significativa na sobrevida entre os animais tratados com trilostano e mitotano (HELM *et al.*, 2011; ARENAS *et al.*, 2014; MARÇAL *et al.*, 2017), os dois principais fármacos utilizados. No caso de tratamento cirúrgico, cães com TAF submetidos à adrenalectomia têm uma sobrevida de 492 a 953 dias, podendo viver até quatro ou cinco anos após o procedimento (SCHWARTZ *et al.*, 2008; LANG *et al.*, 2011; MASSARI *et al.*, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão do presente trabalho serão apresentados no formato de artigos científicos.

4.1 Artigo 1: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em cães com hiperadrenocorticismos espontâneos. Manuscrito redigido nas normas do periódico *Research in Veterinary Science*.

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em cães com hiperadrenocorticismo espontâneo

RESUMO

Este estudo prospectivo teve o objetivo de mensurar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como parâmetro de estresse oxidativo, além de investigar a hipótese de sua correlação com parâmetros cardiovasculares e laboratoriais, em cães com hiperadrenocorticismo espontâneo (HAC). Vinte e cinco cães com HAC, divididos em um grupo com HAC (n = 16) e outro grupo com HAC e presença de degeneração valvar mitral (DVM) concomitante (n = 9), foram avaliados em três diferentes tempos: no momento do diagnóstico, seis e doze meses após o início do tratamento medicamentoso com trilostano. Um grupo controle (n = 20) de cães desprovidos de doenças sistêmicas e com perfil semelhante ao dos animais doentes também foi avaliado. Houve diferença significativa ($p < 0,001$) na mensuração de TBARS entre o grupo HAC no momento do diagnóstico ($4,38 \pm 1,16$ MDA/mg de proteína) e o grupo controle ($2,15 \pm 0,45$ MDA/mg de proteína). Não houve diferença na concentração de TBARS entre os grupos HAC e HAC + DVM ($p = 0,980$). Após o tratamento clínico, houve uma redução significativa ($p < 0,001$) na mensuração de TBARS no grupo HAC. A mensuração de TBARS teve correlação positiva com o hematócrito e com a relação átrio esquerdo/aorta nos cães com HAC. O presente estudo conclui que há peroxidação lipídica excessiva no hiperadrenocorticismo canino e sugere que esse estresse oxidativo é controlado com o tratamento médico da doença.

Palavras-chave: ecocardiograma, endocardiose, estresse oxidativo, pressão arterial, remodelamento cardíaco, síndrome de Cushing, trilostano.

1. Introdução

O hiperadrenocorticismismo (HAC) é uma das endocrinopatias mais comumente atendidas na rotina médica de cães, caracterizada por sinais clínicos como poliúria, polidipsia, polifagia, distensão abdominal e alopecia (Behrend et al., 2013), além de complicações multissistêmicas que incluem alterações cardiovasculares, como hipertensão arterial sistêmica e remodelamento miocárdico (Chen et al., 2014; Goy-Thollot et al., 2002; Hurley e Vaden, 1998; Novellas et al., 2008; Ortega et al., 1996; Takano et al., 2015). No entanto, a fisiopatologia de tais alterações cardiovasculares não está totalmente esclarecida e, dentre as teorias investigadas, pode ser considerada a possibilidade do envolvimento de estresse oxidativo.

A literatura é controversa quanto aos possíveis efeitos do cortisol no estresse oxidativo, e sugere tanto um possível efeito benéfico (Marumo et al., 1998) quanto maléfico (De et al., 2004; Flaherty et al., 2017). Dentre os marcadores laboratoriais que avaliam o estresse oxidativo, está a mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que avalia a peroxidação lipídica que caracteriza a lesão de membrana celular causada pelos radicais livres em excesso (Sagols e Priymenko, 2011). Estudos recentes evidenciaram a utilidade da mensuração de TBARS para avaliar o estresse oxidativo em diversas doenças caninas, como neoplasia mamária (Karayannopoulou et al., 2013), doença renal crônica (Silva et al., 2013), linfoma multicêntrico (Bottari et al., 2015), doença inflamatória intestinal (Rubio et al., 2017) e insuficiência cardíaca por degeneração valvar mitral ou cardiomiopatia dilatada (Verk et al., 2017). Em humanos, os radicais livres provenientes do estresse oxidativo atuam como mensageiros intracelulares, levando a remodelamento miocárdico e a riscos cardiovasculares possivelmente associados à

mortalidade (Byrne et al., 2003; Karamouzis et al., 2015). A possibilidade do envolvimento de estresse oxidativo nas alterações cardiovasculares ainda não foi estudada no HAC canino.

O presente estudo teve o objetivo de mensurar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como parâmetro de estresse oxidativo em cães com HAC espontâneo no momento do diagnóstico e após o tratamento medicamentoso. Ainda, visou investigar a hipótese de o estresse oxidativo correlacionar-se com parâmetros hematológicos, bioquímicos e cardiovasculares em cães com HAC.

2. Material e métodos

2.1. Seleção de pacientes

O presente trabalho foi um estudo prospectivo de coorte que incluiu cães com HAC selecionados a partir de atendimento no serviço de endocrinologia de um hospital veterinário. O estudo teve autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição (protocolo #31830) e um termo de consentimento foi assinado pelos tutores responsáveis. Para inclusão no estudo, os cães tiveram o diagnóstico de HAC baseado no histórico médico, sinais clínicos, exame físico, patologia clínica, ultrassonografia abdominal e testes endócrinos compatíveis com HAC (teste de supressão por baixa dose de dexametasona e/ou teste de estimulação com ACTH). Foram critérios de exclusão para o estudo a presença de alterações como: doença renal (caracterizada por elevação sérica de creatinina/ureia, alterações ultrassonográficas), comorbidades endócrinas, cardiopatias (com exceção da degeneração valvar mitral), histórico recente de doenças com impacto sistêmico e/ou uso

recente de medicamentos que poderiam interferir nos parâmetros avaliados, como corticosteroides, diuréticos, vasodilatadores e antiarrítmicos.

Os pacientes com HAC foram avaliados em três diferentes tempos: no momento do diagnóstico (T0), seis meses após o início do tratamento (T1) e doze meses após o início do tratamento (T2). Os pacientes com HAC foram divididos em dois grupos: HAC, hiperadrenocorticismo; e HAC + DVM, hiperadrenocorticismo com presença de degeneração valvar mitral como comorbidade diagnosticada na avaliação em T0. Um grupo controle foi composto por cães selecionados por conveniência e com perfil demográfico semelhante ao dos pacientes doentes, mas considerados saudáveis por meio do histórico médico, do exame físico e exames complementares. Os animais do grupo controle foram avaliados em dois momentos (T0 e T1), com um intervalo de seis meses.

2.2. Exames laboratoriais

A coleta de amostras de sangue foi feita através de punção venosa jugular a vácuo, após antissepsia adequada do local, com auxílio de agulha 21G. As amostras foram coletadas em tubos de 2 mL com etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA-K2) para hemograma completo e em tubos de 4 mL sem anticoagulante para perfil bioquímico e mensuração de TBARS. Os animais estavam em jejum alimentar de 12 horas no momento da coleta. A amostra com EDTA-K2 foi utilizada para realização de hemograma completo (Procyte DX Hematology Analyzer, Idexx Laboratories) e a contagem diferencial foi realizada por microscopia do esfregaço sanguíneo. O perfil bioquímico (ensaio colorimétrico, CM-200, Wiener) foi composto por mensuração de albumina, alanina

aminotransferase (ALT), cálcio total, colesterol total, creatinina, fosfatase alcalina (FA), fósforo, fructosamina, glicose, ureia e triglicerídeos.

A peroxidação lipídica foi mensurada através da técnica TBARS com uma amostra de soro obtido do sangue coletado em tubo sem anticoagulante, centrifugado e congelado a -20°C em tubos tipo eppendorf por um período de até 60 dias. O teste TBARS mede o malondialdeído (MDA), composto gerado em reações de peroxidação de lipídeos, sendo indicador de estresse oxidativo. Para esta avaliação, foi utilizada a técnica descrita por Ohkawa et al. (1979) modificada. Em um tubo tipo eppendorf, foram pipetados na seguinte ordem: 0,3 mL de ácido tricloroacético a 10%, 0,1 mL da amostra de soro, 0,2 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,67%. Após, a amostra do tubo foi agitada e incubada a 100°C durante 15 minutos, formando um produto corado. Os tubos então foram resfriados em gelo durante 5 minutos e foram acrescentados na amostra 0,6 mL de butanol. Depois disso, a amostra foi colocada em agitador por 45 segundos e centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi colocado na cubeta do espectrofotômetro para a leitura num comprimento de onda de 535 nm. O resultado foi representado em nmoles MDA/mg de proteína.

2.3. Avaliações cardiovasculares

Todos os animais foram submetidos à ecodopplercardiograma (Sonosite Micromaxx, transdutores setoriais de 1-5 e 4-8 MHz) realizado pelo mesmo examinador, sendo os pacientes posicionados em decúbito lateral esquerdo para obter os cortes paraesternais esquerdo e direito, eixo curto e eixo longo. Foram utilizados modo unidimensional, bidimensional e Doppler (colorido, pulsado e contínuo). Em cada exame foram avaliados: átrio direito; átrio esquerdo (AE); diâmetro da artéria aorta (Ao); a relação

AE/Ao; espessura diastólica do septo interventricular (SID) e da parede livre do ventrículo esquerdo (PLVE); cavidade do ventrículo esquerdo em sístole (DVEs) e diástole (DVEd) e do ventrículo direito em diástole; fração de encurtamento; fração de ejeção; e fluxos sanguíneos nas valvas mitral, tricúspide, aórtica e pulmonar. A função diastólica foi avaliada pelo tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e pelo padrão de enchimento ventricular esquerdo, através da velocidade das ondas E e A.

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada após um período de cerca de dez minutos para adaptação dos cães ao ambiente e aos examinadores, utilizando o método de ultrassonografia Doppler (Medmega DV610) e seguindo as regras de padronização previamente estabelecidas pelo consenso do *American College of Veterinary Internal Medicine* (Brown et al., 2007). O valor médio de cinco aferições de PAS com valores consistentes foi considerado para análise estatística.

2.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 20.0. As variáveis categóricas foram descritas por frequências e percentuais, pelo teste exato de Fisher para comparação entre os grupos e o teste de McNemar para comparação entre os tempos. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e desvio padrão (quando sua distribuição foi simétrica) e mediana, mínimo e máximo (quando sua distribuição foi assimétrica). As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram comparadas através do teste t de Student, enquanto que as variáveis com distribuição assimétrica foram comparadas pelo teste de Wilcoxon entre os tempos e o teste de Mann-Whitney entre os grupos. A análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey foi utilizada

para comparar a mensuração de TBARS entre os grupos. Para avaliar a evolução do TBARS ao longo do tempo, foi utilizado o modelo de equações de estimativas generalizadas (GEE). O teste de correlação de Pearson foi utilizado para relacionar a mensuração de TBARS com os demais parâmetros. Foi considerado um nível de significância de 5% para as comparações estabelecidas.

3. Resultados

Quarenta e oito cães foram avaliados durante a pesquisa, sendo que 45 foram incluídos na análise estatística, divididos nos três grupos: hiperadrenocorticismo (HAC, n = 16 cães), hiperadrenocorticismo com a presença de degeneração valvar mitral como comorbidade (HAC + DVM, n = 9 cães) e grupo controle (GC, n = 20 cães). Três cães avaliados para participar do grupo controle foram descartados (dois por apresentarem degeneração valvar mixomatosa e um por apresentar nefropatia). No grupo HAC, foram 15 cães com HAC pituitário-dependente e um com HAC por tumor adrenal funcional, enquanto que no grupo HAC + DVM todos os cães foram classificados como HAC pituitário-dependente. De acordo com o consenso de diagnóstico e tratamento da degeneração valvar mitral (Atkins et al., 2009), os nove pacientes do grupo HAC + DVM foram classificados em: estágio B1, pacientes assintomáticos e sem remodelamento cardíaco (n = 4); estágio B2, assintomáticos, com aumento do lado esquerdo do coração (n = 3); estágio C, pacientes com sinais clínicos associados à doença cardíaca (n = 2). A Tabela 1 apresenta o perfil demográfico dos pacientes incluídos no estudo.

No grupo HAC, dos 16 cães que participaram da avaliação no momento diagnóstico, nove foram avaliados após seis meses (quatro cães morreram, um tutor optou por deixar de participar do estudo e dois tutores não tiveram disponibilidade de levar o seu animal) e onze foram avaliados após 12 meses do diagnóstico. Após esta última avaliação, os animais foram acompanhados a distância por pelo menos três meses, havendo a morte de um paciente neste período. Os cães dos grupos HAC e HAC + DVM foram submetidos a tratamento clínico com trilostano, iniciado logo após a confirmação do diagnóstico. Os ajustes de dose de trilostano foram definidas pela equipe de endocrinologia responsável pelos casos, de acordo com a resposta clínica individual dos pacientes. As doses iniciais de tratamento foram de 0,41 a 0,99 mg/kg ($0,67 \pm 0,21$ mg/kg), variando de 0,7 a 3,23 mg/kg ($1,34 \pm 0,8$ mg/kg) na avaliação de seis meses e de 0,6 a 3,43 mg/kg ($1,9 \pm 0,96$ mg/kg) na avaliação de doze meses após o diagnóstico.

Dentre os pacientes do grupo HAC que fizeram as avaliações em T0 e T1, três receberam algum tipo de fármaco com propriedades antioxidantes entre as duas consultas (ômega 3, silimarina ou s-adenosil-metionina). Para descartar uma possível influência destes fármacos no resultado da comparação entre a mensuração de TBARS antes e após o tratamento, a variação do parâmetro entre os dois tempos de avaliação foi comparada entre os pacientes com ou sem uso de antioxidante, e não houve diferença significativa nestes animais ($p = 0,381$).

Houve diferença significativa ($p < 0,001$) na mensuração de TBARS entre o grupo HAC no momento do diagnóstico ($4,38 \pm 1,16$ nmoles MDA/mg de proteína) e o grupo controle ($2,15 \pm 0,45$ nmoles MDA/mg de proteína), conforme mostra a Figura 1. O grupo HAC + DVM no momento do diagnóstico também teve concentração de TBARS ($4,45 \pm$

0,94 nmoles MDA/mg de proteína) elevada em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). No entanto, não houve diferença significativa ($p = 0,980$) na concentração de TBARS quando comparados o grupo HAC com o grupo HAC + DVM no momento do diagnóstico.

Os pacientes do grupo HAC apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) na mensuração de TBARS, comparando a primeira avaliação no momento do diagnóstico ($4,38 \pm 1,16$ nmoles MDA/mg de proteína) com a segunda avaliação seis meses após ($2,42 \pm 0,47$ nmoles MDA/mg de proteína) e a terceira avaliação um ano depois ($1,86 \pm 0,76$ nmoles MDA/mg de proteína), conforme mostra a Figura 2. Entre a segunda e a terceira avaliações, a redução na concentração de TBARS não foi significativa ($p = 0,072$). Não houve diferença significativa ($p = 0,843$) na mensuração de TBARS entre o grupo HAC após seis meses de tratamento ($2,42 \pm 0,47$ nmoles MDA/mg de proteína) e o grupo controle na segunda avaliação ($2,72 \pm 0,97$ nmoles MDA/mg de proteína). No grupo controle, houve variação significativa ($p = 0,03$) entre as avaliações nos momentos T0 e T1, caracterizada por um aumento na concentração de TBARS ($2,15 \pm 0,45$ para $2,72 \pm 0,97$ nmoles MDA/mg de proteína, respectivamente). Não houve diferença significativa ($p = 0,221$) na concentração de TBARS no momento do diagnóstico entre os cães do grupo HAC que morreram ($n = 5$; TBARS = $3,84 \pm 1,16$ nmoles MDA/mg de proteína) e os cães que permaneceram vivos até o fim do estudo ($n = 11$; TBARS = $4,63 \pm 1,13$ nmoles MDA/mg de proteína).

As Tabelas 2 e 3 apresentam, respectivamente, as correlações da concentração de TBARS com parâmetros laboratoriais e cardiovasculares no grupo HAC no momento diagnóstico.

Tabela 1

Características demográficas da população de cães avaliada. Para idade e peso corporal, os dados estão apresentados na forma de média, desvio padrão e intervalo.

Características demográficas	Grupo HAC (n = 16)	Grupo controle (n = 20)	Grupo HAC + DVM (n = 9)
Sexo			
Macho			
Inteiro	2	1	2
Castrado	1	10	3
Fêmea			
Inteira	-	-	-
Castrada	13	9	4
Idade (anos)	10,2 ± 3,0 [5 - 15]	10,2 ± 2,8 [6 - 15]	12,2 ± 2,9 [6 - 16]
Peso corporal (kg)	11,4 ± 8,9 [2,6 - 33,2]	8,5 ± 5,5 [2,1 - 23,0]	8,4 ± 6,3 [1,6 - 17,5]
Raça			
Yorkshire Terrier	4	5	2
Lhasa Apso	3	2	-
Australian Cattle Dog	1	-	-
Boxer	1	-	-
Cocker	-	-	1
Maltês	1	1	1
Schnauzer miniatura	1	1	-
Pinscher	1	-	-
Poodle	-	2	-
Dachshund	1	2	2
Shihtzu	1	1	-
Sem raça definida	2	6	3

Tabela 2

Correlações de Pearson (r) e valor de probabilidade (P) da concentração de TBARS com parâmetros laboratoriais em cães com hiperadrenocorticismo.

Parâmetro laboratorial	TBARS	
	R	P
Eritrócitos	0,359	0,207
Hemoglobina	0,507	0,064
Hematócrito	0,585	0,028*
VCM	- 0,072	0,808
CHCM	0,147	0,616
Leucócitos totais	0,303	0,293
Neutrófilos segmentados	0,328	0,252
Eosinófilos	- 0,087	0,768
Monócitos	0,283	0,327
Linfócitos	- 0,272	0,347
PPT	0,364	0,201
Plaquetas	- 0,079	0,818
Albumina	0,032	0,907
ALT	0,488	0,055
Cálcio	-0,386	0,304
Colesterol	0,461	0,072
Creatinina	- 0,062	0,819
FA	0,345	0,190
Fósforo	0,033	0,903
Fructosamina	-0,135	0,631
Glicose	0,186	0,506
Ureia	0,063	0,817
Triglicerídeos	-0,141	0,603

VCM, volume corpuscular médio; CHCM, concentração da hemoglobina corpuscular média; PPT, proteínas plasmáticas totais; ALT, alanina aminotransferase; FA, fosfatase alcalina.

*Indica uma correlação significativa ($p < 0,05$).

Tabela 3

Correlações de Pearson (r) e valor de probabilidade (P) da concentração de TBARS com parâmetros cardiovasculares no grupo HAC no momento diagnóstico.

Parâmetro cardiovascular	TBARS	
	R	P
Frequência cardíaca	0,147	0,616
Pressão arterial sistólica	0,082	0,764
AE	0,042	0,878
Ao	0,199	0,461
Relação AE/Ao	0,511	0,043*
Ventrículo direito	0,082	0,763
Septo interventricular	0,193	0,475
Parede livre VE	0,275	0,302
Diâmetro diastólico VE	0,206	0,444
Diâmetro sistólico VE	0,162	0,548
Fração de encurtamento	0,074	0,785
Fração de ejeção	0,033	0,903
Velocidade fluxo aórtico	0,389	0,137
Gradiente fluxo aórtico	0,326	0,219
Velocidade fluxo pulmonar	0,265	0,321
Gradiente fluxo pulmonar	0,241	0,368
Onda E	0,010	0,972
Onda A	0,119	0,660
Relação E/A	- 0,063	0,817
Tempo de relaxamento isovolumétrico	- 0,080	0,769

AE, átrio esquerdo; Ao, aorta; VE, ventrículo esquerdo.

*Indica uma correlação significativa ($p < 0,05$).

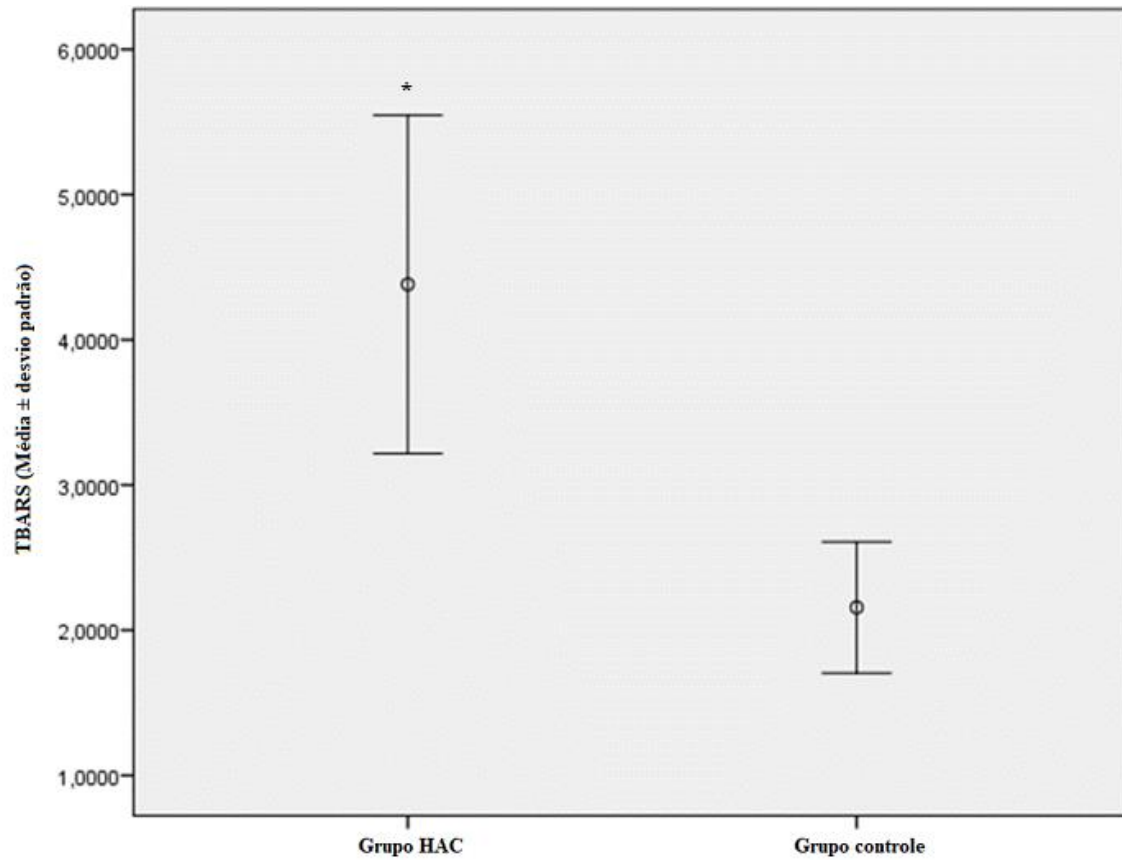


Fig. 1. Mensuração de TBARS (nmoles MDA/mg de proteína) no grupo HAC no momento do diagnóstico e no grupo controle na primeira avaliação.
*Indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$).

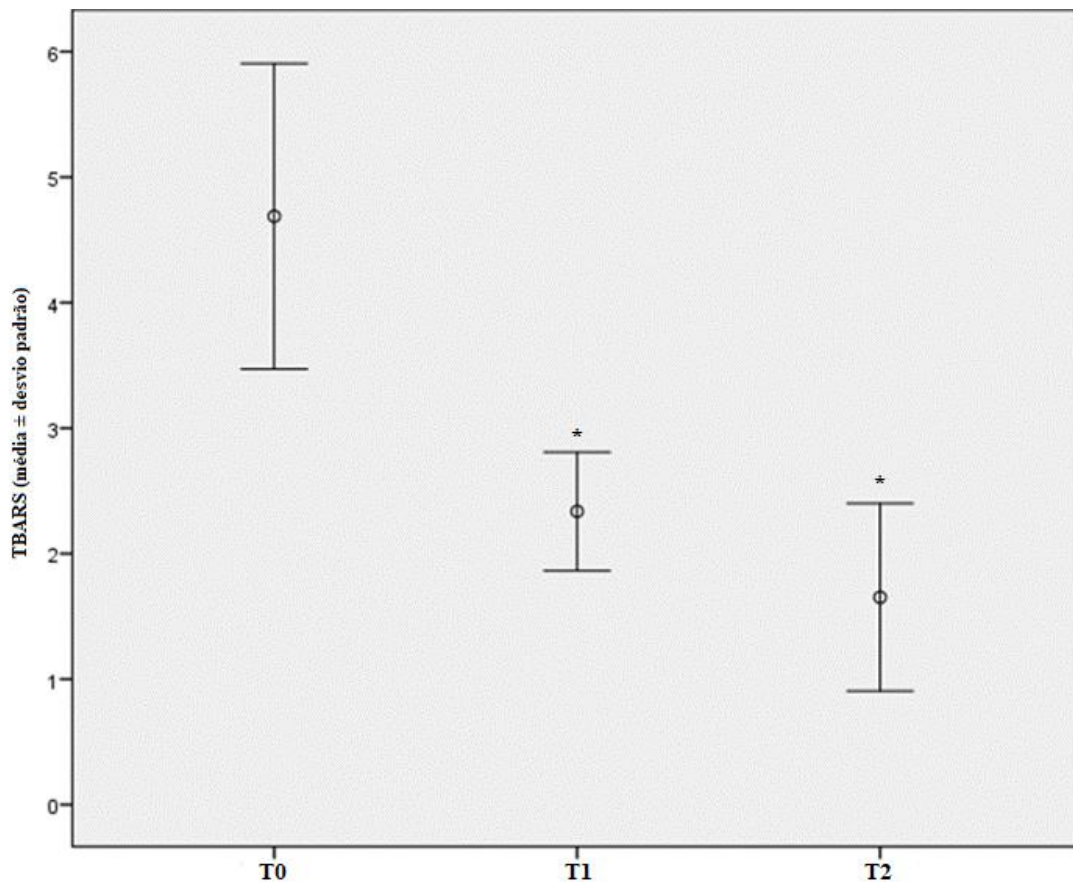


Fig. 2. Mensuração de TBARS (nmoles MDA/mg de proteína) em cães com HAC na primeira avaliação (diagnóstico), segunda avaliação (seis meses após início de tratamento) e terceira avaliação (12 meses após início de tratamento).

*Indica uma diferença significativa com relação ao T0 (p < 0,001).

4. Discussão

Não foram encontrados na literatura consultada estudos que tenham avaliado estresse oxidativo em cães com HAC. No presente estudo, foi observado um efeito significativo da presença de HAC sobre o estresse oxidativo. Em equinos com HAC naturalmente adquirido, não foi demonstrada evidência de peroxidação lipídica através da mensuração de malondialdeído (MDA), porém foi sugerida a presença de estresse oxidativo

mensurado por outros parâmetros (Keen et al., 2004). Em humanos com HAC, foi evidenciada a presença de estresse oxidativo significativamente aumentado nos pacientes com hipercortisolismo por meio da concentração de MDA, quando comparados aos pacientes com a doença controlada e pacientes de um grupo controle saudável (Prázný et al., 2008) de forma similar aos resultados aqui documentados. No conhecimento dos autores, o presente estudo é o primeiro trabalho que investiga o estresse oxidativo através do MDA no HAC canino e, assim como em humanos e equinos, os resultados sugerem a presença de estresse oxidativo em cães com HAC.

Os efeitos do hipercortisolismo no fenômeno de estresse oxidativo ainda são controversos na literatura. Um estudo que investigou a ação de glicocorticoides em cultivo de células da musculatura lisa aórtica sugeriu a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo produzir um efeito protetor local na formação da lesão vascular (Marumo et al., 1998). Por outro lado, estudos mais recentes sugerem um efeito diferente dos glicocorticoides, que causa aumento dos níveis de ROS em humanos (Flaherty et al., 2017) e peixes (Espinoza et al., 2017), além do aumento da peroxidação lipídica em humanos (De et al., 2004). Em cães, um estudo evidenciou tanto elevação de cortisol quanto de estresse oxidativo durante o exercício, no entanto, não analisou a correlação entre os parâmetros (Huntingford et al., 2014).

Assim como no presente estudo, em medicina humana foi evidenciada redução significativa da peroxidação lipídica ao tratar o HAC e estabilizar o hipercortisolismo (Prázný et al., 2008). Apesar do presente estudo não ter incluído a avaliação dos testes endócrinos para mensuração de cortisol simultaneamente à dosagem de MDA, o controle clínico e o acompanhamento hormonal pelo médico veterinário endocrinologista

permitiram avaliar que os cães estavam com a doença controlada. De acordo com Vincent e Taylor (2006), a obesidade é um importante fator associado ao estresse oxidativo que pode ser reduzido com perda de peso, restrição calórica e dietas ricas em antioxidantes. Um estudo evidenciou aumento da peroxidação lipídica através de MDA em cães hiperlipidêmicos não controlados, quando comparados a cães não hiperlipidêmicos ou hiperlipidêmicos tratados e controlados (Li et al., 2014). O HAC canino pode causar deposição de gordura abdominal, além de sobrepeso ou obesidade (Behrend et al. 2013; O'Neill et al., 2016; Peterson, 2007). No presente estudo, entre o momento do diagnóstico (T0) e a avaliação após seis meses de tratamento (T1), houve redução de peso corporal ($8,9 \pm 6,4$ kg para $8,3 \pm 5,8$ kg, $p = 0,8352$), redução de triglicerídeos ($255,19 \pm 194,13$ mg/dL para $206,55 \pm 142,76$ mg/dL, $p = 0,485$) e redução de colesterol total ($284,33 \pm 171,8$ g/dL para $230,67 \pm 85,6$ g/dL, $p = 0,239$), apesar de não serem alterações significativas. Assim, é possível que a obesidade e a hiperlipidemia tenham um papel menos relevante no estresse oxidativo do HAC canino, sendo o próprio efeito do hipercortisolismo na peroxidação lipídica o mais importante. Diversos estudos evidenciaram as propriedades de fármacos antioxidantes e hepatoprotetores em cães (Au et al., 2013; Barrouin-Melo et al., 2016; Varzi et al., 2007), sendo que tais fármacos são frequentemente prescritos em casos de HAC. A comparação entre os valores de TBARS dos pacientes do presente estudo que receberam ou não antioxidantes auxiliou a descartar uma possível influência destes fármacos no resultado, sendo possível sugerir que o controle da peroxidação lipídica foi influenciado principalmente pelo controle do hipercortisolismo.

A mensuração de TBARS até o presente momento é, principalmente, experimental e os diferentes métodos e ensaios empregados nesta análise fazem com que exista na

literatura uma variabilidade nos valores de referência deste parâmetro. O aumento na concentração de MDA nos cães do grupo controle entre a primeira e a segunda avaliação (após 6 meses) é um resultado inesperado, uma vez que os animais foram considerados saudáveis através da avaliação clínica. Um estudo mostrou que existe um aumento das enzimas antioxidantes com o envelhecimento em cães, o que parece ser um mecanismo compensatório ao aumento de substâncias reativas ao oxigênio com o avanço da idade (Tomsic et al., 2016). Outro trabalho evidenciou que, com o envelhecimento, os cães possuem uma capacidade reduzida de defender o organismo contra as ROS (Alexander et al., 2018). Portanto, é possível que este aumento nos cães do grupo controle esteja associado ao avanço da idade, o que pode não ter sido observado nos cães com HAC pois o valor de MDA estava aumentado devido ao hipercortisolismo e foi controlado com o tratamento clínico durante o acompanhamento dos pacientes. Em um trabalho que avaliou a estabilidade de amostras de soro canino para análise de estresse oxidativo, apesar de a temperatura de -80°C oferecer uma melhor estabilidade por longos períodos, foi evidenciado que as amostras para avaliação de TBARS congeladas a -20°C possuem boa estabilidade por um período de 60 dias (Rubio et al., 2018), o que reforça que as amostras deste estudo estavam viáveis para mensuração.

A eritrocitose é uma das alterações laboratoriais comuns no HAC canino (Behrend et al., 2013), uma vez que o cortisol pode ter efeito eritropoético sobre a medula. Além desta alteração, uma possível desidratação subclínica causada pela poliúria poderia estar associada à correlação positiva entre hematócrito e TBARS.

O cálculo da relação AE/Ao através de medidas ecocardiográficas é uma das técnicas que apresenta boa viabilidade e reprodutibilidade para avaliação do tamanho de

átrio esquerdo em cães (Höllmer et al., 2016). Um estudo em pacientes humanos com fibrilação atrial associou o processo de estresse oxidativo ao tamanho de átrio esquerdo (Li et al., 2017). Outro estudo, em humanos com regurgitação valvar mitral, evidenciou resultados que permitiram aos autores formular uma teoria de aumento atrial como consequência da entrada de íons cálcio e da peroxidação lipídica causados pelo estresse oxidativo (Chen et al., 2009). Apesar de o presente estudo avaliar uma doença de natureza endócrina em cães, a correlação positiva entre a relação AE/Ao e a concentração de TBARS permite levantar a hipótese de o estresse oxidativo apresentar algum envolvimento com o aumento atrial no HAC canino. Outra hipótese é que a diferença no tamanho atrial esteja relacionada às oscilações da pré-carga, determinada por um volume circulante variável devido ao quadro de polidipsia típico do HAC, ou ainda, que tenha relação a eventuais efeitos mineralocorticoides do cortisol.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um achado que aparece em 59 a 86% dos cães com hiperadrenocorticismo (Goy-Thollot et al., 2002; Hurley e Vaden, 1998; Novellas et al., 2008; Ortega et al., 1996), no entanto, a fisiopatologia do desenvolvimento da HAS nesta síndrome ainda não é totalmente esclarecida. Diversos trabalhos sugerem uma relação entre HAS e o processo de estresse oxidativo, envolvendo peroxidação lipídica, disfunção endotelial e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (Montezano et al., 2015; Pawluk et al., 2017; Viridis et al., 2013; Yavuzer et al., 2016). Estudos que avaliaram a pressão arterial no HAC evidenciaram correlação entre marcadores de estresse oxidativo e a pressão arterial diastólica em humanos (Karamouzis et al., 2015) e em cães (Vidal et al., 2018), mas não foi verificada correlação com a pressão arterial sistólica. Apesar de aferir

apenas a pressão arterial sistólica, o presente trabalho não evidenciou correlação entre TBARS e hipertensão nos pacientes com HAC na população estudada.

Foi permitida a inclusão de cães em diferentes estágios de DVM no grupo HAC + DVM, pois um estudo prévio não verificou relação entre o estresse oxidativo e o estágio clínico da DVM, incluindo a avaliação do MDA entre os parâmetros (Reimann et al., 2017). A literatura ainda é controversa sobre o envolvimento do estresse oxidativo na DVM canina. Verk et al. (2017) não verificaram diferença significativa nos parâmetros de estresse oxidativo entre cães saudáveis e cardiopatas, no entanto, demonstraram associação entre MDA e peptídeo natriurético cerebral, um biomarcador cardíaco. Freeman et al. (2005) não evidenciaram diferença significativa de MDA entre cães com DVM e cães saudáveis, no entanto, outro parâmetro estudado, o isoprostano, evidenciou aumento da peroxidação lipídica no grupo doente. O presente estudo sugere que a DVM como comorbidade parece não influenciar no processo de estresse oxidativo dos cães com HAC.

5. Conclusões

O presente estudo conclui que a peroxidação lipídica está aumentada no hiperadrenocorticismismo canino, sendo a mensuração de TBARS um método útil para a avaliação do estresse oxidativo na doença. Este estresse oxidativo não parece estar correlacionado à presença de hipertensão arterial sistêmica, no entanto, esteve correlacionado à dimensão atrial esquerda avaliada pela ecocardiografia convencional. Ainda, o estudo sugere que o controle da doença utilizando tratamento medicamentoso com trilostano é benéfico para normalização do estado de estresse oxidativo. Além disso, a

presença de degeneração valvar mitral como comorbidade não influenciou no estresse oxidativo da população de cães com HAC estudada.

Referências

- Alexander, J.E., Colyer, A., Haydock, R.M., Hayek, M.G., Park, J. 2018. Understanding How Dogs Age: Longitudinal Analysis of Markers of Inflammation, Immune Function, and Oxidative Stress. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 73(6), 720-728.
- Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Häggström, J., Hamlin, R., Keene, B., Luis-Fuentes, V., Stepien, R. 2009. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Canine Chronic Valvular Heart Disease. *J. Vet. Intern. Med.* 23(6), 1142-1150.
- Au, A.Y., Hasenwinkel, J.M., Frondoza, C.G. 2013. Hepatoprotective effects of S-adenosylmethionine and silybin on canine hepatocytes in vitro. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97(2), 331-341.
- Barrouin-Melo, S.M., Anturaniemi, J., Sankari, S., Griinari, M., Atroshi, F., Ounjaijean, S., Hielm-Björkman, A.K. 2016. Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil. *Lipids Health Dis.* 15(1):139.
- Behrend, E.N., Kooistra, H.S., Nelson, R., Reusch, C.E., Scott-Moncrieff, J.C. 2013. Diagnosis of Spontaneous Canine Hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement (Small Animal). *J. Vet. Intern. Med.* 27(6), 1292-1304.

- Bottari, N.B., Munhoz, T.D., Torbitz, V.D., Tonin, A.A., Anai, L.A., Semolin, L.M., Jark, P.C., Bollick, Y.S., Moresco, R.N., França, R.T., Lopes, S.T., Stefani, L.M., Tinucci-Costa, M., Da Silva, A.S. 2015. Oxidative stress in dogs with multicentric lymphoma: Effect of chemotherapy on oxidative and antioxidant biomarkers. *Redox Report* 20(6), 267-274.
- Brown, S., Atkins, C., Bagley, R., Carr, A., Cowgill, L., Davidson, M., Egner, B., Elliot, J., Henik, R., Labato, M., Littman, M., Polzin, D., Ross, L., Snyder, P., Stepien, R. 2007. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 21(3), 542-558.
- Byrne, J.A., Grieve, D.J., Cave, A.C., Shah, A.M. 2003. Oxidative stress and heart failure. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 96(3), 214-221.
- Chen, M., Chang, J., Liu, W., Yang, C., Chen, C., Fang, C., Hsieh, Y., Wang, Y., Chang, H. 2009. Increased serum oxidative stress in patients with severe mitral regurgitation: a new finding and potential mechanism for atrial enlargement. *Clin. Biochem.* 42, 943-948.
- Chen, H., Lien, Y., Huang, H. 2014. Assessment of left ventricular function by two-dimensional speckle-tracking echocardiography in small breed dogs with hyperadrenocorticism. *Acta Vet. Scand.* 56(88), 1-10.
- De, K., Roy, K., Saha, A., Sengupta, C. 2004. Exploring effects of different antioxidants on dexamethasone-induced lipid peroxidation using common laboratory markers. *Acta Pol. Pharm.* 61(1), 77-86.

- Espinoza, M.B., Aedo, J.E., Zuloaga, R., Valenzuela, C., Molina, A., Valdés, J.A. 2017. Cortisol induces reactive oxygen species through a membrane glucocorticoid receptor in rainbow trout myotubes. *J. Cell. Biochem.* 118, 718-725.
- Flaherty, R.L., Owen, M., Fagan-Murphy, A., Intabli, H., Healy, D., Patel, A., Allen, M.C., Patel, B.A., Flint, M.S. 2017. Glucocorticoids induce production of reactive oxygen species/reactive nitrogen species and DNA damage through an iNOS mediated pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 19(1), 35.
- Freeman, L.M., Rush, J.E., Milbury, P.E., Blumberg, J.E. 2005. Antioxidant Status and Biomarkers of Oxidative Stress in Dogswith Congestive Heart Failure. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 537-541.
- Goy-Thollot, I., Péchereau, D., Kéroack, S., Dezempte, J.C., Bonnet, J.M. 2002. Investigation of the role of aldosterone in hypertension associated with spontaneous pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Small Anim. Pract.* 43, 489-492.
- Höllmer, M., Willesen, J.L., Tolver, A., Koch, J. 2016. Comparison of four echocardiographic methods to determine left atrial size in dogs. *J. Vet. Cardiol.* 18(2), 137-145.
- Huntingford, J.L., Levine, C.B., Mustacich, D.J., Corrigan, D., Downey, R.L., Wakshlag, J.J. 2014. The effects of low intensity endurance activity on various physiological parameters and exercise induced oxidative stress in dogs. *Open J. Vet. Med.* 4, 134-144.
- Hurley, K.G, Vaden, S.L. 1998. Evaluation of urine protein content in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 369-373.

- Karamouzis, I., Berardelli, R., D'Angelo, V., Fussotto, B., Zichi, C., Giordano, R., Settanni, F., Maccario, M., Ghigo, E., Arvat, E. 2015. Enhanced oxidative stress and platelet activation in patients with Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol.* 82(4), 517-524.
- Karayannopoulou, M., Fytianou, A., Assaloumidis, N., Psalla, D., Constantinidis, T.C., Kaldrymidou, E., Koutinas, A.F. 2013. Markers of lipid peroxidation and α -tocopherol levels in the blood and neoplastic tissue of dogs with malignant mammary gland tumors. *Vet. Clin. Pathol.* 42(3), 323-328.
- Keen, J.A., McLaren, M., Chandler, K.J., McGorum, B.C. 2004. Biochemical indices of vascular function, glucose metabolism and oxidative stress in horses with equine Cushing's disease. *Equine Vet. J.* 36(3), 226-229.
- Li, G.; Kawasumi, K., Okada, Y., Ishikawa, S., Yamamoto, I., Arai, T., Mori, N. 2014. Comparison of plasma lipoprotein profiles and malondialdehyde between hyperlipidemia dogs with/without treatment. *BMC Vet. Res.* 10, 67.
- Li, J.Y., He, Y., Ke, H.H., Jin, Y., Jiang, Z.Y., Zhong, G.Q. 2017. Plasma oxidative stress and inflammatory biomarkers are associated with the sizes of the left atrium and pulmonary vein in atrial fibrillation patients. *Clin. Cardiol.* 40(2), 89-94.
- Marumo, T., Schini-Kerth, V.B., Brandes, R.P., Busse R. 1998. Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22 phox mRNA expression in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 32(6), 1083-1088.

- Montezano, A.C., Dulak-Lis, M., Tsiropoulou, S., Harvey, A., Briones, A.M., Touyz, R.M. 2015. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can. J. Cardiol.* 31(5), 631-641.
- Novellas, R., De Gopegui, R.R., Espada, Y. 2008. Determination of renal vascular resistance in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Vet. Rec.* 163, 592-596.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95(2), 351-358.
- O'Neill, D.G., Scudder, C., Faire, J.M., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., Brodbelt, D.C. 2016. Epidemiology of hyperadrenocorticism among 210,824 dogs attending primary-care veterinary practices in the UK from 2009 to 2014. *J. Small Anim. Pract.* 57, 365-373.
- Ortega, T.M., Feldman, E.C., Nelson, R.W., Willits, N., Cowgill, L.D. 1996. Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209(10), 1724-1729.
- Pawluk, H., Pawluk, R., Robaczewska, J., Kedziora-Kornatowska, K., Kedziora, J. 2017. Biomarkers of antioxidant status and lipid peroxidation in elderly patients with hypertension. *Redox Rep.* 22(6), 542-546.
- Peterson, M.E. 2007. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 22, 2-11.
- Prázný, M., Jezková, J., Horová, E., Lazárová, V., Hána, V., Kvasnicka, J., Pecen, L., Marek, J., Skrha, J., Krsek, M. 2008. Impaired microvascular reactivity and

- endothelial function in patients with Cushing's syndrome: influence of arterial hypertension. *Physiol. Res.* 57(1), 13-22.
- Reimann, M.J., Häggström, J., Moller, J.E., Lykkesfeldt, J., Falk, T., Olsen, L.H. 2017. Markers of oxidative stress in dogs with myxomatous mitral valve disease are influenced by sex, neuter status, and serum cholesterol concentration. *J. Vet. Intern. Med.* 31, 295-302.
- Rubio, C.P., Martínez-Subiela, S., Hernández-Ruiz, J., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J.J., Allenspach, K. 2017. Serum biomarkers of oxidative stress in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Vet. J.* 221, 56-61.
- Rubio, C.P.; Tvarijonaviciute, A., Caldin, M., Hernández-Ruiz, J., Cerón, J.J., Martínez-Subiela, S., Tecles, F. 2018. Stability of biomarkers of oxidative stress in canine serum. *Res. Vet. Sci.* 121, 85-93.
- Sagols, E., Priymenko, N. 2011. Oxidative stress in dog with heart failure: the role of dietary Fatty acids and antioxidants. *Vet. Med. Int.* 6, 180206.
- Silva, A.C., Almeida, B.F., Soeiro, C.S., Ferreira, W.L., Lima V.M., Ciarlini, P.C. 2013. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. *Can. J. Vet. Res.* 77(2), 136-141.
- Takano, H., Kokubu, A., Sugimoto, K., Sunahara, H., Aoki, T., Fijii, Y. 2015. Left ventricular structural and functional abnormalities in dogs with hyperadrenocorticism. *J. Vet. Cardiol.* 17(3), 173-181.

- Tomsic, K., Alenka, S., Lukanc, B., Svete A.N. 2016. Plasma Total Antioxidant Capacity and Activities of Blood Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase Determined in Healthy Dogs by Using Commercially Available Kits. *Acta Vet-Beograd.* 66(4), 534-548.
- Varzi, H.N., Esmailzadeh, S., Morovvati, H., Avizeh, R., Shahriari, A., Givi, M.E. 2007. Effect of silymarin and vitamin E on gentamicin-induced nephrotoxicity in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30(5), 477-81.
- Verk, B., Svete, A.N., Salobir, J., Rezar, V., Petric, A.D. 2017. Markers of oxidative stress in dogs with heart failure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29(5), 636-644.
- Vidal, P.N., Miceli, D.D., Arias, E.S., D'Anna, E., García, J.D., Castillo, V.A. 2018. Decrease of nitric oxide and increase in diastolic blood pressure are two events that affect renal function in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. *Open Vet. J.* 8(1), 86-9.
- Vincent, H.K., Taylor, A.G. 2006. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int. J. Obes.* 30, 400-418.
- Viridis, A., Bacca, A., Colucci, R., Duranti, E., Fornai, M., Materazzi, G., Ippolito, C., Bernardini, N., Blandizzi, C., Bernini, G., Taddei, S. 2013. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertension* 62(2), 337-344.
- Yavuzer, H., Yavuzer, S., Cengiz, M., Erman, H., Doventas, A., Balci, H., Erdinçler, D.S., Uzun, H. 2016. Biomarkers of lipid peroxidation related to hypertension in aging. *Hypertens. Res.* 39(5), 342-348.

4.2 Artigo 2: Avaliação prospectiva de indicadores cardiovasculares e laboratoriais em cães com hiperadrenocorticismismo espontâneo. Manuscrito redigido nas normas do periódico *Journal of Veterinary Medical Science*.

Avaliação prospectiva de indicadores cardiovasculares e laboratoriais em cães com hiperadrenocorticismismo espontâneo

RESUMO

O hiperadrenocorticismismo (HAC) é umas das principais endocrinopatias em cães e seu prognóstico depende, entre outros fatores, do desenvolvimento de complicações da doença e da presença de comorbidades. Este estudo prospectivo teve como objetivo avaliar parâmetros cardiovasculares, hematológicos e bioquímicos em cães com HAC, visando definir possíveis alterações com valor prognóstico na sobrevida da doença. Os cães com HAC foram avaliados em três momentos (diagnóstico, após seis meses e após doze meses de tratamento medicamentoso com trilostano) e acompanhados por um tempo de seguimento de até 766 dias. Os parâmetros avaliados foram comparados com cães que apresentaram degeneração valvar como comorbidade (n = 9) e cães de um grupo controle (n = 20). A curva de sobrevida não evidenciou diferença entre os cães apenas com HAC e os cães com HAC e DVM (p = 0,632). A ocorrência de dispneia no momento do diagnóstico foi significativamente maior (p = 0,036) nos cães com HAC que morreram ao longo do tempo de acompanhamento, quando comparados aos cães que permaneceram vivos. O estudo concluiu que a idade avançada no momento do diagnóstico foi o principal

parâmetro relacionado à menor sobrevida na população de cães com HAC estudada, possivelmente associada a alterações laboratoriais como linfopenia. O trabalho não evidenciou influência de parâmetros cardiovasculares na expectativa de vida, no entanto, concluiu que a dispneia no momento do diagnóstico foi um sinal clínico associado a pior prognóstico.

PALAVRAS-CHAVE: comorbidades, dispneia, idade, prognóstico, síndrome de Cushing.

O hiperadrenocorticismismo (HAC) é uma síndrome importante na medicina de pequenos animais, sendo a endocrinopatia mais atendida em cães no Sul do Brasil [47]. A doença é caracterizada por uma variedade de sinais clínicos com impacto sistêmico que afetam diversos parâmetros laboratoriais e cardiovasculares [40, 46]. O grupo de risco é caracterizado por cães de idade média a avançada, principalmente de pequeno porte, semelhante ao observado para outras doenças, como a degeneração valvar mitral [32, 62].

O prognóstico e a sobrevida no HAC canino dependem de fatores como o estado de saúde geral, o comprometimento do tutor com o tratamento e o desenvolvimento de complicações da doença [40]. Além destes fatores, não é claro o quanto a presença de comorbidades pode influenciar na sobrevida de cães com HAC. A sobrevida média em cães submetidos a tratamento medicamentoso varia entre 14 a 30 meses [3, 7, 25, 40].

O presente estudo teve como objetivo avaliar parâmetros cardiovasculares, hematológicos e bioquímicos em cães com hiperadrenocorticismismo espontâneo, visando definir possíveis alterações com valor prognóstico na sobrevida da doença. Ainda, o estudo

teve como objetivo avaliar a hipótese de uma possível influência da degeneração valvar mitral como comorbidade na sobrevida de cães com HAC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos pacientes

Este foi um estudo prospectivo de coorte, autorizado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocolo #31830) e com termo de livre consentimento assinado pelos tutores responsáveis pelos cães. Cães com HAC foram selecionados após atendimento em um serviço de endocrinologia veterinária, com diagnóstico definido a partir do histórico médico, sinais clínicos, exame físico, patologia clínica, ultrassonografia abdominal e testes endócrinos compatíveis com HAC (teste de supressão por baixa dose de dexametasona e/ou teste de estimulação com ACTH). O grau de controle do HAC ao longo do tratamento foi avaliado por meio de informações de anamnese e dos resultados de teste de estimulação com ACTH feitos de acordo com a solicitação do médico veterinário endocrinologista responsável pelo tratamento do paciente. Os cães com HAC foram avaliados em três diferentes tempos: momento do diagnóstico (T0), seis meses após a primeira avaliação (T1) e 12 meses após a primeira avaliação (T2). Ainda, foi feito um acompanhamento à distância sobre o quadro clínico dos pacientes por um período de até um ano após a última avaliação.

Foram critérios de exclusão para o estudo a presença de alterações como: doença renal (caracterizada por elevação sérica de creatinina/ureia, alterações ultrassonográficas), comorbidades endócrinas, cardiopatias previamente diagnosticadas, histórico recente de

doenças com impacto sistêmico e/ou uso recente de medicamentos que poderiam interferir nos parâmetros avaliados, como corticosteroides, diuréticos, vasodilatadores e antiarrítmicos. Pacientes com hiperadrenocorticismismo e degeneração valvar mitral (DVM) descoberta no momento da primeira avaliação foram incluídos (grupo HAC + DVM) e acompanhados durante o mesmo período, com o intuito de avaliar a influência desta comorbidade cardíaca no tempo de sobrevivência dos cães com HAC. O diagnóstico de DVM foi baseado na avaliação ecocardiográfica, o teste considerado padrão-ouro para diagnóstico e estadiamento da doença, através de alterações como espessamento e presença de pequenos nódulos nos folhetos valvares [10, 14, 57].

Um grupo controle de cães com perfil demográfico semelhante ao dos pacientes doentes, desprovidos de doenças sistêmicas conhecidas e sem alterações ao exame clínico foi recrutado por conveniência e submetido à mesma avaliação dos cães com HAC em dois tempos, com intervalo de seis meses (T0 e T1).

Exames laboratoriais

A coleta de amostras de sangue foi feita por punção venosa jugular a vácuo, após antissepsia adequada do local, com auxílio de agulha 21G. As amostras foram coletadas em tubos de 2 mL com etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA-K2) e em tubos de 4 mL sem anticoagulante. Os animais estavam em jejum alimentar de 12 horas no momento da coleta. A amostra com EDTA-K2 foi utilizada para realização hemograma completo (Procyte DX Hematology Analyzer, Idexx Laboratories) e a contagem diferencial foi realizada por microscopia do esfregaço sanguíneo. As amostras dos tubos sem anticoagulante, após retração do coágulo por 30 minutos, foram centrifugadas por 10

minutos para obtenção de soro e destinadas à avaliação do perfil bioquímico (ensaio colorimétrico, CM-200, Wiener), composto por mensuração de albumina, alanina aminotransferase (ALT), cálcio total, colesterol total, creatinina, fosfatase alcalina (FA), fósforo, fructosamina, glicose, ureia e triglicerídeos.

Exames cardiovasculares

Todos os animais foram submetidos à ecodopplercardiograma (Sonosite Micromaxx, transdutores setoriais de 1-5 e 4-8 MHz) realizado pelo mesmo examinador, sendo os pacientes posicionados em decúbito lateral esquerdo, para realizar os cortes paraesternais esquerdo e direito, eixo curto e eixo longo. Foram utilizados modo unidimensional, bidimensional e Doppler (colorido, pulsado e contínuo). Em cada exame foram avaliados: átrio direito; átrio esquerdo (AE); diâmetro da artéria aorta (Ao); a relação AE/Ao; espessura diastólica do septo interventricular (SID) e da parede livre do ventrículo esquerdo (PLVE); cavidade do ventrículo esquerdo em sístole (DVEs) e diástole (DVEd) e do ventrículo direito em diástole; fração de encurtamento; fração de ejeção; e fluxos sanguíneos nas valvas mitral, tricúspide, aórtica e pulmonar. A função diastólica foi avaliada pelo tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e pelo padrão de enchimento ventricular esquerdo, através da velocidade das ondas E e A.

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada após um período de cerca de dez minutos para adaptação dos cães ao ambiente e aos examinadores, utilizando método de ultrassonografia Doppler (Medmega DV610) e seguindo as regras de padronização previamente estabelecidas pelo consenso do *American College of Veterinary Internal*

Medicine [11]. O valor médio de cinco aferições de PAS com valores consistentes foi considerado para análise estatística.

Para a realização do eletrocardiograma (ECG), os pacientes foram posicionados em decúbito lateral direito, sem contenção farmacológica, conforme padronização estabelecida [61]. O traçado eletrocardiográfico foi registrado durante dois minutos nas derivações I, II, III, aVR, aVL e aVF, e as derivações pré-cordiais (rV2, V2, V4 e V10), utilizando aparelho de eletrocardiografia computadorizada (ECG-PC TEB). Para interpretação de cada exame, foram avaliados ritmo cardíaco, frequência cardíaca, duração e amplitude da onda P, intervalo PR, duração do complexo QRS, amplitude da onda R e da onda T, intervalo QT, segmento ST e eixo elétrico. O ritmo cardíaco foi considerado para avaliação estatística descritiva.

Além dos parâmetros laboratoriais e cardiovasculares, os animais foram avaliados quanto ao tempo de sobrevivência e a ocorrência de sinais clínicos relacionados ao envolvimento do sistema cardiocirculatório, através de questionário feito aos tutores. Dentre estes sinais, foram considerados dispneia, intolerância ao exercício, tosse, cianose, síncope e qualidade do sono.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 20.0. As variáveis categóricas foram descritas por frequências e percentuais, pelo teste exato de Fisher para comparação entre os grupos e o teste de McNemar para comparação entre os tempos. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e desvio padrão (quando sua distribuição foi simétrica) e mediana, mínimo e máximo (quando sua distribuição foi

assimétrica). As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram comparadas através do teste t de Student, enquanto que as variáveis com distribuição assimétrica foram comparadas pelo teste de Wilcoxon entre os tempos e o teste de Maan-Whitney entre os grupos. Foi considerado um nível de significância de 5% para as comparações estabelecidas.

RESULTADOS

Quarenta e cinco cães foram avaliados durante o estudo. O grupo de cães com HAC que atendeu os critérios de inclusão foi composto por 16 animais (13 fêmeas castradas, dois machos inteiros e um macho castrado), sendo 15 com HAC pituitário-dependente e um com HAC por tumor adrenal funcional. Foram quatro cães da raça Yorkshire terrier, três da raça Lhasa Apso, dois sem raça definida e um de cada das raças Australian Cattle Dog, Boxer, Maltês, Schnauzer miniatura, Pinscher, Dachshund e Shihtzu. A média de idade foi de $10,2 \pm 3,0$ anos (5 a 15 anos) enquanto a média de peso foi de $11,4 \pm 8,9$ kg (2,6 a 33,2 kg). No grupo HAC, dos 16 cães que participaram da avaliação no momento diagnóstico, nove foram avaliados após seis meses do diagnóstico (quatro cães morreram, um tutor optou por deixar de participar do estudo e dois tutores não tiveram disponibilidade de regressar com o animal) e onze cães foram avaliados após doze meses do diagnóstico, sendo que um destes morreu entre a última avaliação (T2) e o final do tempo de seguimento (até um ano após). Durante o acompanhamento, os cães com HAC foram submetidos a tratamento clínico com trilostano, sendo os ajustes de doses definidos pela equipe de endocrinologia responsável pelos casos. Inicialmente, foram prescritas doses de 0,41 a 0,99 mg/kg ($0,67 \pm 0,21$ mg/kg)

BID, variando de 0,7 a 3,23 mg/kg ($1,34 \pm 0,8$ mg/kg) BID na avaliação de seis meses (T1) e 0,6 a 3,43 mg/kg ($1,9 \pm 0,96$ mg/kg) BID na avaliação de doze meses (T2).

Nove cães (quatro fêmeas castradas, dois machos inteiros e três machos castrados) com HAC apresentaram degeneração valvar mitral (DVM) como comorbidade. Todos os cães deste grupo foram diagnosticados com HAC pituitário-dependente. De acordo com o estadiamento da insuficiência cardíaca proposto para cães com a doença [4], quatro cães foram classificados no estágio B1, três cães no estágio B2 e dois cães no estágio C. Estes animais foram descartados do grupo HAC, no entanto, formaram um grupo (HAC + DVM) para ter a sobrevida comparada ao grupo HAC. O grupo HAC + DVM foi composto por três cães sem raça definida, dois da raça Dachshund, dois da raça Yorkshire Terrier e um de cada das raças Cocker Spaniel Americano e Maltês, com uma média de idade de $12,2 \pm 2,9$ anos (6 a 16 anos) e uma média de peso de $8,4 \pm 6,3$ kg (1,6 a 17,5 kg). Os cães pertencentes a este grupo foram submetidos ao tratamento do hiperadrenocorticismo, seguindo os mesmos critérios terapêuticos do grupo HAC. Além disso, para os pacientes estagiados em B2 e C, foi recomendada terapêutica seguindo os critérios do consenso da DVM [4].

O grupo de animais controles foi composto por 20 cães (nove fêmeas castradas, um macho inteiro e dez machos castrados), sendo seis sem raça definida, cinco da raça Yorkshire Terrier, dois da raça Dachshund, dois da raça Poodle, dois da raça Lhasa Apso, um de cada das raças Schnauzer miniatura, Maltês e Shihtzu, com uma média de idade de $10,2 \pm 2,8$ anos (6 a 15 anos) e uma média de peso de $8,5 \pm 5,5$ kg (2,1 a 23,0 kg). Além destes 20 animais, três cães avaliados para participar do grupo controle foram excluídos do estudo (dois por apresentarem degeneração valvar mixomatosa e um por apresentar

nefropatia). No grupo controle, dos 20 cães que participaram da primeira avaliação, 17 foram avaliados após seis meses. Um animal morreu entre a primeira e a segunda avaliação (devido a complicações de uma insuficiência hepática de origem não esclarecida) e dois animais não foram avaliados por falta de disponibilidade dos tutores.

As Tabelas 1 e 2 mostram a comparação dos parâmetros, respectivamente, laboratoriais e cardiovasculares, entre o grupo HAC e o grupo controle (ambos no momento da primeira avaliação). As Tabelas 3 e 4 mostram o acompanhamento, respectivamente, dos parâmetros laboratoriais e cardiovasculares, do grupo HAC durante os três momentos de avaliação. Os sinais clínicos cardiorrespiratórios de maior ocorrência no grupo HAC no momento do diagnóstico foram intolerância ao exercício (12/16 cães, 75%) e dispneia (6/16 cães, 37,5%). Quando comparados ao grupo controle, tanto a ocorrência de intolerância ao exercício ($p < 0,001$) quanto de dispneia ($p = 0,03$) foram significativamente maiores no grupo HAC.

Dos 16 cães avaliados no grupo HAC, cinco pacientes morreram (sobrevida de 54 a 373 dias) e onze pacientes permaneceram vivos ao final do estudo (tempo de seguimento entre 465 e 766 dias). Não houve diferença significativa no peso entre os pacientes que morreram ($17,4 \pm 12,0$ kg) e os que permaneceram vivos ($8,6 \pm 5,9$ kg) até o final do seguimento ($p = 0,064$). No entanto, houve diferença ($p = 0,001$) na idade dos pacientes que morreram ($13,4 \pm 1,1$ anos), quando comparados aos pacientes que permaneceram vivos ($8,7 \pm 2,4$ anos) até o final do estudo. As Tabelas 5 e 6 mostram a comparação de parâmetros, respectivamente, laboratoriais e cardiovasculares, entre os pacientes do grupo HAC que morreram e os que permaneceram vivos até o final do estudo. Ao comparar os sinais clínicos entre os cães vivos e mortos do grupo HAC no momento da primeira

avaliação, não foram observadas diferenças significativas na ocorrência de tosse, intolerância ao exercício, cianose, síncope e qualidade do sono. Porém, em relação à dispneia, houve uma ocorrência significativamente maior ($p = 0,036$) nos animais que morreram (quatro dos cinco cães) em relação aos que permaneceram vivos (dois dos onze cães). De acordo com as informações fornecidas pelos tutores, as causas de morte nos cães do grupo HAC foram: neoplasia hepática (2), neoplasia abdominal (1), doença renal (1) e eutanásia devido a complicações do HAC (1). Apenas um destes pacientes foi submetido à necropsia, sendo confirmada como causa da morte a ruptura de um hemangiossarcoma hepático.

Dos nove cães avaliados no grupo HAC + DVM, quatro pacientes morreram (sobrevida de 47 a 115 dias) e cinco permaneceram vivos ao final do estudo (tempo de seguimento de 387 a 654 dias). No grupo controle, um paciente morreu (sobrevida de 198 dias) e 19 pacientes permaneceram vivos ao final do estudo (tempo de seguimento entre 302 e 570 dias). A Figura 1 mostra a curva de sobrevida comparando cães dos grupos HAC e HAC + DVM ao longo do tempo de seguimento ($p = 0,632$). O tempo de sobrevida foi considerado o intervalo entre a primeira avaliação do paciente (momento do diagnóstico) e a sua morte, independente da causa. De acordo com as informações fornecidas pelos tutores, as causas de morte no grupo HAC + DVM foram: edema pulmonar (2), complicações decorrentes de uma mucocele (1) e causa não esclarecida (1).

Em relação à ocorrência de arritmias cardíacas verificadas através do ECG, no grupo HAC um cão apresentou taquicardia sinusal, dois cães apresentaram parada e/ou bloqueio sinusal, um cão apresentou bloqueio de fascículo anterior esquerdo e um cão apresentou complexos ventriculares prematuros isolados; no grupo HAC + DVM, três cães

apresentaram parada e/ou bloqueio sinusal; e, no grupo controle, seis cães apresentaram taquicardia sinusal, um cão apresentou parada e/ou bloqueio sinusal e um cão apresentou complexos ventriculares prematuros isolados.

Tabela 1. Parâmetros laboratoriais (média \pm desvio padrão ou mediana e percentil) de cães com hiperadrenocorticismo (grupo HAC) no momento do diagnóstico e cães do grupo ontrele.

Parâmetro (unidade)	Grupo HAC	Grupo Controle	P
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,32 \pm 0,81	7,68 \pm 0,64	0,162
Hemoglobina (g/dL)	16,98 \pm 1,71	17,54 \pm 1,54	0,329
Hematócrito (%)	49,14 \pm 4,05	49,84 \pm 4,26	0,638
VCM (fL)	68,21 \pm 5,15	65,99 \pm 4,24	0,185
CHCM (%)	34,44 \pm 1,21	34,23 \pm 3,66	0,833
Leucócitos totais ($/\mu\text{L}$)	9562,86 \pm 2553,78	9278,95 \pm 2298,21	0,740
Neutrófilos segmentados ($/\mu\text{L}$)	7527,64 \pm 2572,36	6651,32 \pm 2392,88	0,322
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	337,36 \pm 284,34	443,05 \pm 281,1	0,296
Monócitos ($/\mu\text{L}$)	506,86 \pm 334,56	397,74 \pm 258,35	0,298
Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	1190,36 \pm 522,68	1780,53 \pm 803,38	0,016*
PPT (g/L)	75,71 \pm 7,96	74,95 \pm 6,97	0,771
Plaquetas ($/\mu\text{L}$)	405,18 \pm 146,93	381,5 \pm 126,2	0,669
Albumina (g/L)	34,25 \pm 3,416	35,15 \pm 1,631	0,344
ALT (U/L)	72,0 [32,0 – 494,0]	44,0 [17,0 – 88,0]	0,027*
Cálcio (mg/dL)	10,78 \pm 0,97	10,44 \pm 1,01	0,399
Colesterol (g/dL)	256,44 \pm 136,17	227,3 \pm 53,39	0,386
Creatinina (mg/dL)	0,7 \pm 0,23	1,07 \pm 0,47	0,007*
FA (U/L)	231,0 [41 – 3366]	63,0 [25 – 316]	< 0,001*
Fósforo (mg/dL)	73,0 \pm 6,2	72,11 \pm 5,16	0,644
Fructosamina ($\mu\text{mol/L}$)	209,82 \pm 39,32	258,19 \pm 42,77	0,002*
Glicose (mg/dL)	121,8 \pm 16,83	118,55 \pm 22,36	0,641
Ureia (mg/dL)	43,63 \pm 20,28	42,85 \pm 17,95	0,904
Triglicerídeos (mg/dL)	199,5 [81 – 800]	82,5 [17,0 – 279,0]	0,002*

VCM, volume corpuscular médio; CHCM, concentração da hemoglobina corpuscular média; PPT, proteínas plasmáticas totais; ALT, alanina aminotransferase, FA, fosfatase alcalina.

*Indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros cardiovasculares (média \pm desvio padrão) de cães com hiperadrenocorticismo (grupo HAC) no momento do diagnóstico e cães do grupo Controle.

Parâmetro (unidade)	Grupo HAC	Grupo Controle	P
FC (bpm)	115,94 \pm 20,63	135,58 \pm 34,57	0,055
PAS (mmHg)	183,94 \pm 44,05	164,68 \pm 27,8	0,126
AE (cm)	2,52 \pm 0,6	2,31 \pm 0,48	0,261
Ao (cm)	1,9 \pm 0,55	1,82 \pm 0,38	0,627
Relação AE/Ao	1,35 \pm 0,15	1,28 \pm 0,11	0,117
Ventrículo direito (cm)	1,09 \pm 0,33	1,09 \pm 0,35	0,997
Septo interventricular (cm)	0,69 \pm 0,2	0,62 \pm 0,16	0,277
PLVE (cm)	0,60 \pm 0,19	0,54 \pm 0,16	0,292
DVEs (cm)	2,85 \pm 0,63	2,65 \pm 0,41	0,270
DVEd (cm)	1,69 \pm 0,43	1,60 \pm 0,26	0,469
Fração de encurtamento (%)	40,7 \pm 5,4	39,7 \pm 4,6	0,522
Fração de ejeção (%)	73,0 \pm 6,2	72,11 \pm 5,16	0,644
Velocidade FLAo (cm/s)	110,9 \pm 22,8	95,7 \pm 11,5	0,025*
Gradiente FLAo (mmHg)	5,11 \pm 2,21	3,71 \pm 0,9	0,027*
Velocidade FLP (cm/s)	93,4 \pm 15,12	94,72 \pm 26,33	0,860
Gradiente FLP (mmHg)	3,58 \pm 1,14	3,84 \pm 2,49	0,699
Onda E (cm/s)	69,49 \pm 12,47	70,9 \pm 14,91	0,768
Onda A (cm/s)	69,2 \pm 12,64	72,88 \pm 13,64	0,424
Relação E/A	1,04 \pm 0,3	0,98 \pm 0,23	0,555
TRIV (ms)	62,5 \pm 9,13	58,68 \pm 14,89	0,379

FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; AE, átrio esquerdo; Ao, artéria aorta; PLVE, parede livre do ventrículo esquerdo; DVEd, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DVEs, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; FLAo, fluxo aórtico; FLP, fluxo pulmonar; TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico.

*Indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros laboratoriais (média \pm desvio padrão) de cães do grupo HAC durante o tempo de acompanhamento.

Parâmetro (unidade)	T 0	T1	T2
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,5 \pm 0,93	7,82 \pm 0,88	7,21 \pm 0,87
Hemoglobina (g/dL)	17,76 \pm 1,66	18,29 \pm 2,03	16,88 \pm 2,0
Hematócrito (%)	50,6 \pm 4,1	51,1 \pm 3,9	47,4 \pm 6,4
VCM (fL)	67,95 \pm 5,05	65,66 \pm 3,96	65,68 \pm 2,51
CHCM (%)	35,05 \pm 1,02	35,75 \pm 2,64	35,71 \pm 1,73
Leucócitos totais ($/\mu\text{L}$)	9887,5 \pm 3119,27	10087,5 \pm 1865,04	9990 \pm 2722,11
Neutrófilos segmentados ($/\mu\text{L}$)	7645,13 \pm 3166,58	7370,13 \pm 1983,7	7529,7 \pm 2540,38
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	316,75 \pm 287,64	528,25 \pm 624,2	412,0 \pm 402,08
Monócitos ($/\mu\text{L}$)	499,75 \pm 369,33	498,88 \pm 170,62	498,8 \pm 270,79
Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	1424,75 \pm 525,77	1690,25 \pm 612,05	1549,8 \pm 408,13
Proteína total (g/L)	79,5 \pm 6,99	81,0 \pm 12,87	75,4 \pm 16,89
Plaquetas ($/\mu\text{L}$)	380,4 \pm 121,66	386,0 \pm 155,82	407,67 \pm 224,8
Albumina (g/L)	35,22 \pm 2,73	33,11 \pm 5,16	33,45 \pm 3,08*
ALT (U/L)	113,22 \pm 145,98	87,22 \pm 56,13	81,45 \pm 33,83
Cálcio (mg/dL)	10,85 \pm 1,21	9,29 \pm 0,48*	9,71 \pm 1,95
Colesterol (g/dL)	284,33 \pm 171,8	230,67 \pm 85,6	257,55 \pm 145,12
Creatinina (mg/dL)	0,62 \pm 0,18	0,7 \pm 0,28	0,81 \pm 0,23*
FA (U/L)	625,4 \pm 1066,67	257,53 \pm 240,14	289,82 \pm 247,75
Fósforo (mg/dL)	5,59 \pm 2,3	4,57 \pm 2,2	6,7 \pm 4,64
Fructosamina ($\mu\text{mol/L}$)	225,41 \pm 38,73	254,13 \pm 51,3	253,1 \pm 86,19
Glicose (mg/dL)	128,33 \pm 16,4	140,0 \pm 50,67	117,7 \pm 19,48
Ureia (mg/dL)	41,22 \pm 20,15	38,89 \pm 10,2	45,64 \pm 19,78
Triglicerídeos (mg/dL)	364,11 \pm 197,85	651,56 \pm 1157,41	379,36 \pm 590,83

T0, momento do diagnóstico; T1, seis meses após a primeira avaliação; T2, doze meses após a primeira avaliação; VCM, volume corpuscular médio; CHCM, concentração da hemoglobina corpuscular média; ALT, alanina aminotransferase, FA, fosfatase alcalina.

*Indica uma diferença significativa com relação ao T0 ($p < 0,05$).

Tabela 4. Parâmetros cardiovasculares (média \pm desvio padrão) de cães do grupo HAC durante o tempo de acompanhamento.

Parâmetro (unidade)	T0	T1	T2
FC (bpm)	121,1 \pm 25,0	119,2 \pm 31,5	112,1 \pm 23,85
PAS (mmHg)	198,7 \pm 50,8	181,2 \pm 53,1	178,36 \pm 34,74
AE (cm)	2,32 \pm 0,43	2,23 \pm 0,46	2,45 \pm 0,7
Ao (cm)	1,73 \pm 0,41	1,67 \pm 0,37	1,81 \pm 0,54
Relação AE/Ao	1,35 \pm 0,15	1,35 \pm 0,18	1,36 \pm 0,13
Ventrículo direito (cm)	1,03 \pm 0,35	1,12 \pm 0,44	1,12 \pm 0,59
Septo interventricular (cm)	0,62 \pm 0,14	0,63 \pm 0,14	0,62 \pm 0,16
PLVE (cm)	0,55 \pm 0,16	0,54 \pm 0,13	0,54 \pm 0,19
DVEd (cm)	2,74 \pm 0,68	2,69 \pm 0,76	2,78 \pm 0,67
DVEs (cm)	1,61 \pm 0,45	1,64 \pm 0,55	1,70 \pm 0,46
Fração de encurtamento (%)	41,3 \pm 5,4	39,4 \pm 5,3	38,96 \pm 5,46
Fração de ejeção (%)	73,8 \pm 5,9	71,7 \pm 7,2	71,0 \pm 6,88
Velocidade FLAo (cm/s)	110,5 \pm 12,08	104,04 \pm 13,95	96,82 \pm 19,47
Gradiente FLAo (mmHg)	4,94 \pm 1,07	4,4 \pm 1,17	3,89 \pm 1,52
Velocidade FLP (cm/s)	95,96 \pm 13,1	88,2 \pm 17,2	88,88 \pm 17,46
Gradiente FLP (mmHg)	3,74 \pm 1,02	3,22 \pm 1,28	3,27 \pm 1,32
Onda E (cm/s)	73,06 \pm 11,39	66,08 \pm 9,64	65,19 \pm 9,41
Onda A (cm/s)	66,69 \pm 15,4	63,38 \pm 13,83	65,37 \pm 12,19
Relação E/A	1,14 \pm 0,31	1,13 \pm 0,32	1,05 \pm 0,32
TRIV (ms)	60,56 \pm 7,68	60,56 \pm 11,58	67,0 \pm 12,29

T0, momento do diagnóstico; T1, seis meses após a primeira avaliação; T2, doze meses após a primeira avaliação; FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; AE, átrio esquerdo; Ao, artéria aorta; PLVE, parede livre do ventrículo esquerdo; DVEd, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DVEs, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; FLAo, fluxo aórtico; FLP, fluxo pulmonar; TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico.

Nenhum dos parâmetros apresentou diferença significativa comparados ao T0 ($p < 0,05$).

Tabela 5. Parâmetros laboratoriais (média \pm desvio padrão) dos cães do grupo HAC, comparando os pacientes que permaneceram vivos e os pacientes que morreram até o final do tempo de acompanhamento.

Parâmetro (unidade)	Grupo HAC vivos (n = 11)	Grupo HAC mortos (n = 5)	P
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,49 \pm 0,84	6,9 \pm 0,66	0,232
Hemoglobina (g/dL)	17,6 \pm 1,51	15,42 \pm 1,14	0,024*
Hematócrito (%)	50,3 \pm 3,8	46,25 \pm 3,5	0,091
VCM (fL)	67,56 \pm 4,54	69,82 \pm 6,95	0,479
CHCM (%)	34,96 \pm 0,98	33,15 \pm 0,58	0,005*
Leucócitos totais ($/\mu\text{L}$)	9630,0 \pm 2851,53	9395,0 \pm 1953,14	0,884
Neutrófilos segmentados ($/\mu\text{L}$)	7243,3 \pm 2858,84	7788,5 \pm 2006,94	0,821
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	369,4 \pm 280,5	257,25 \pm 319,91	0,527
Monócitos ($/\mu\text{L}$)	467,7 \pm 369,15	604,75 \pm 241,54	0,511
Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	1368,7 \pm 478,59	744,5 \pm 354,45	0,037*
PPT (g/L)	78,0 \pm 6,99	70,0 \pm 8,16	0,089
Plaquetas ($/\mu\text{L}$)	360,0 \pm 110,64	484,25 \pm 185,43	0,191
Albumina (g/L)	35,64 \pm 2,62	31,2 \pm 3,14	0,01*
ALT (U/L)	125,73 \pm 143,07	138,4 \pm 158,1	0,777
Cálcio (mg/dL)	10,81 \pm 1,03	10,54 \pm	0,809
Colesterol (g/dL)	274,18 \pm 158,39	217,4 \pm 63,61	0,459
Creatinina (mg/dL)	0,65 \pm 0,18	0,8 \pm 0,31	0,217
FA (U/L)	565,33 \pm 967,27	573,8 \pm 522,04	0,336
Fósforo (mg/dL)	72,82 \pm 6,61	73,4 \pm 5,86	0,869
Fructosamina ($\mu\text{mol/L}$)	217,79 \pm 38,6	187,9 \pm 37,11	0,204
Glicose (mg/dL)	124,09 \pm 17,44	115,5 \pm 15,33	0,402
Ureia (mg/dL)	39,55 \pm 18,41	52,6 \pm 23,43	0,246
Triglicerídeos (mg/dL)	317,36 \pm 205,27	118,4 \pm 44,3	0,015*

VCM, volume corpuscular médio; CHCM, concentração da hemoglobina corpuscular média; PPT, proteínas plasmáticas totais; ALT, alanina aminotransferase, FA, fosfatase alcalina.

*Indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 6. Parâmetros cardiovasculares (média \pm desvio padrão) dos cães do grupo HAC, comparando os pacientes que permaneceram vivos e os pacientes que morreram até o final do tempo de acompanhamento.

Parâmetro (unidade)	Grupo HAC vivos (n = 11)	Grupo HAC mortos (n = 5)	P
FC (bpm)	116,82 \pm 24,53	114,0 \pm 9,19	0,810
PAS (mmHg)	192,09 \pm 47,77	166,0 \pm 31,41	0,287
AE (cm)	2,3 \pm 0,4	3,0 \pm 0,74	0,025*
Ao (cm)	1,71 \pm 0,39	2,32 \pm 0,66	0,036*
Relação AE/Ao	1,36 \pm 0,14	1,32 \pm 0,18	0,666
Ventrículo direito (cm)	1,02 \pm 0,32	1,24 \pm 0,36	0,242
Septo interventricular (cm)	0,62 \pm 0,13	0,83 \pm 0,25	0,038*
PLVE (cm)	0,54 \pm 0,15	0,74 \pm 0,22	0,058
DVEd (cm)	2,75 \pm 0,61	3,07 \pm 0,69	0,366
DVEs (cm)	1,63 \pm 0,41	1,81 \pm 0,51	0,472
Fração de encurtamento (%)	40,6 \pm 5,83	41,0 \pm 4,74	0,905
Fração de ejeção (%)	72,91 \pm 6,55	74,4 \pm 5,86	0,888
Velocidade fluxo aórtico (cm/s)	112,49 \pm 12,83	107,36 \pm 39,0	0,787
Gradiente fluxo aórtico (mmHg)	5,12 \pm 1,16	5,1 \pm 3,86	0,992
Velocidade fluxo pulmonar (cm/s)	97,53 \pm 13,17	84,3 \pm 16,52	0,106
Gradiente fluxo pulmonar (mmHg)	3,87 \pm 1,04	2,93 \pm 1,18	0,129
Onda E (cm/s)	73,24 \pm 10,93	61,24 \pm 12,67	0,073
Onda A (cm/s)	67,04 \pm 14,2	73,96 \pm 7,36	0,327
Relação E/A	1,13 \pm 0,3	0,84 \pm 0,21	0,068
TRIV (ms)	60,91 \pm 7,0	66,0 \pm 12,94	0,318

FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; AE, átrio esquerdo; Ao, artéria aorta; PLVE, parede livre do ventrículo esquerdo; DVEd, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DVEs, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; FLAo, fluxo aórtico; FLP, fluxo pulmonar; TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico.

*Indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

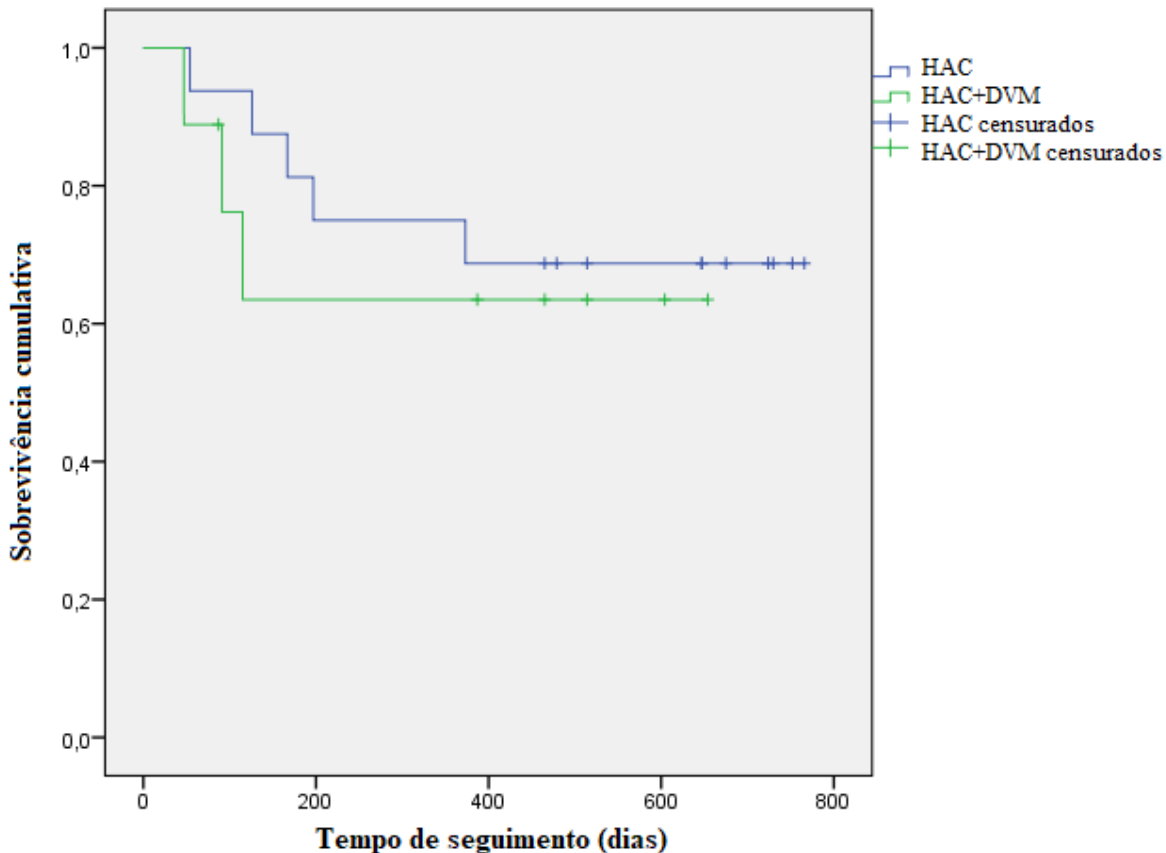


Fig. 1. Curva de sobrevida de cães do grupo HAC comparados ao grupo HAC + DVM.

DISCUSSÃO

O trilostano é um fármaco comumente utilizado no tratamento do HAC canino e age por inibição da 3β -hidroxiesteroide desidrogenase, uma enzima essencial para síntese de cortisol, no córtex adrenal [33]. No presente estudo, os ajustes de controle clínico do HAC foram conduzidos pela equipe de endocrinologia responsável pelos casos. A literatura embasa que o trilostano é efetivo no manejo clínico da doença e apresenta poucos efeitos adversos quando utilizadas doses semelhantes às recebidas pelos pacientes do presente estudo, administradas duas vezes ao dia [2, 3, 15].

Em relação ao perfil de análise laboratorial dos cães com HAC, quando comparados ao grupo controle, predominaram diferenças esperadas para os cães com a doença. O aumento de FA, ALT e triglicérides, além da menor contagem de linfócitos, estão entre achados laboratoriais mais comumente encontradas no HAC canino [8, 46, 51]. Os valores de FA no grupo HAC, além de significativamente mais altos em relação ao grupo controle, foram acima dos valores de referência para a espécie canina. Esta alteração é esperada, uma vez que os cães possuem uma isoforma da FA estimulada pelo cortisol [56, 60]. Além disto, outro fator que pode estar relacionado ao aumento de FA e também justificar a maior atividade de ALT é o fato de os cães com HAC comumente apresentarem hepatomegalia, devido ao acúmulo de glicogênio hepático [21]. A hipertrigliceridemia está associada à redução da depuração de quilomícrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), secundária à diminuição da atividade da lipoproteína lipase [49].

A linfopenia em cães com HAC é resultado de um prejuízo na regulação imunológica, sendo que, além dos efeitos imunossupressores dos glicocorticoides, a conexão entre a glândula hipófise e a produção de hormônios pelo timo podem estar associadas a esta alteração laboratorial [38]. Apesar de concentrações séricas de fructosamina no valor de referência (170 a 338 $\mu\text{mol/L}$) para ambos os grupos, não era esperada uma média significativamente menor no grupo HAC, uma vez o hipercortisolismo pode causar resistência à ação da insulina [8, 37, 42]. Esta variação da fructosamina pode estar relacionada ao aumento do turnover proteico, alteração descrita no hipercortisolismo [12]. Os valores de creatinina sérica, apesar de estarem dentro da referência, foram significativamente menores no grupo HAC quando comparado aos cães saudáveis, o que

pode estar relacionado ao aumento da taxa de filtração glomerular e à perda de massa muscular decorrentes do hipercortisolismo [52, 53].

A hipertensão arterial sistêmica é um achado comum em cães com HAC, afetando 59 a 86% dos pacientes [18, 22, 27, 41, 43]. No presente estudo, 12/16 (75%) dos cães do grupo HAC estavam, no momento do diagnóstico, com valores de pressão arterial sistólica acima de 160 mmHg, valor considerado como hipertensão com risco moderado de dano aos órgãos-alvo [1]. Apesar de um valor médio maior no grupo HAC, não houve diferença significativa na PAS quando comparada ao grupo controle. Um fator que pode estar associado ao valor de PAS acima do esperado no grupo controle é a ansiedade e excitação dos pacientes no momento do exame, o que pode causar valores falsamente elevados no ambiente hospitalar [54]. No grupo controle do presente estudo, 30% dos cães apresentaram taquicardia sinusal evidenciada no ECG, outro achado que pode estar relacionado à ansiedade e excitação. Corroboram ainda com isto as seguintes informações sobre os pacientes do grupo controle com valores de PAS acima de 160 mmHg: nenhum cão apresentou hipertrofia concêntrica ventricular, o que poderia sugerir dano cardíaco como órgão-alvo; estes pacientes foram submetidos à aferição da PAS em casa (apresentando valores abaixo de 160 mmHg, que não foram considerados para a análise estatística) e/ou coletaram amostra para urinálise (não havendo proteinúria, o que poderia sugerir dano renal como órgão-alvo).

Estudos recentes evidenciaram a presença de hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo (caracterizada por aumento da espessura de septo interventricular e parede livre do ventrículo esquerdo) como uma consequência importante do HAC em humanos [5, 31] e em cães [13, 44]. No presente estudo, apesar de valores médios elevados no grupo HAC

quando comparados ao grupo controle, não houve diferença significativa nas medidas de septo interventricular e parede livre do ventrículo esquerdo entre os grupos. Além do impacto estrutural, estudos utilizando técnicas avançadas de diagnóstico por imagem evidenciaram disfunção sistólica e diastólica subclínicas no HAC [13, 31, 44]. Diferentemente das suspeitas iniciais, a hipertensão arterial não é o único fator causador da hipertrofia ventricular esquerda em pacientes com HAC, uma vez que os estudos não definiram associações e correlações positivas entre tais parâmetros [13, 58]. Assim, a teoria sugerindo um efeito direto do cortisol nos cardiomiócitos é uma hipótese discutida atualmente [5]. Nenhum dos estudos citados com avaliação ecocardiográfica sugeriu aumentos da velocidade e gradiente de pressão do fluxo aórtico, no entanto, o foco de muitos destes foi a avaliação da estrutura cardíaca. Uma hipótese que pode justificar tal alteração no presente estudo é o fato de hipercortisolismo causar disfunção endotelial [29, 48], o que pode aumentar a rigidez vascular arterial [16, 35] e, conseqüentemente, essa resistência pode elevar o fluxo na via de saída do ventrículo esquerdo.

Mesmo que no grupo HAC tenham sido descartados os pacientes com comorbidade cardiológica, a ocorrência da intolerância ao exercício e da dispneia é justificada pela própria doença endócrina, uma vez que o hipercortisolismo pode causar alterações como fraqueza muscular, ganho de peso corporal, letargia e tromboembolismo pulmonar [8].

A redução da concentração de albumina durante o tempo de acompanhamento não é um achado comum, mas, dentre as possibilidades está a relação com uma possível proteinúria como consequência da hipertensão [36]. Apesar da diminuição na relação albumina/creatinina urinária após o tratamento com trilostano, um estudo evidenciou que parte dos cães com HAC permanece com proteinúria [52]. No entanto, a avaliação

retrospectiva de dados clínicos dos pacientes do presente estudo possibilitou verificar que, dos 16 cães do grupo HAC, treze realizaram avaliação da relação proteína/creatinina urinária (RPCU) na época do diagnóstico e, de acordo com o consenso da *International Renal Interest Society* [28], apenas três estavam proteinúricos (RCPU > 0,5) e um estava com valor limítrofe (0,2 a 0,5). Uma limitação do presente estudo é que os pacientes não foram submetidos a análise laboratorial da urina nos momentos de avaliação dos demais parâmetros. Apesar de se manter nos valores de referência, assim como observado em outro estudo [52], no presente estudo houve aumento significativo da concentração sérica de creatinina após o tratamento, provavelmente relacionado aos efeitos do hipercortisolismo na taxa de filtração glomerular e eventual ganho de massa muscular. Um estudo em humanos relatou aumento na concentração sérica de cálcio após o uso corticosteroides [24], o que poderia ser relacionado à diminuição na concentração de cálcio no grupo HAC do presente estudo após o tratamento com trilostano. Diferentemente, outras pesquisas em cães mostram que o cálcio sérico não se altera [23] ou até aumenta [59] após o tratamento do HAC.

Não houve diferença significativa nos parâmetros cardiovasculares dos cães com HAC durante o tempo de seguimento do presente estudo. Os valores médios de todos os parâmetros foram semelhantes à referência para a espécie canina durante o estudo, com exceção da PAS que, apesar de reduzir ao longo do tratamento, sempre esteve acima do valor de referência. Estudos em humanos mostram que o controle do HAC como causa de base não é efetivo em controlar a PAS em 25 a 56% dos pacientes hipertensos [16, 17]. Além disso, assim como no presente trabalho, outros estudos em cães com HAC não relataram diminuição significativa da PAS após o tratamento [22, 52, 55].

No presente estudo, 11/16 (68,8%) dos cães do grupo HAC permaneceram vivos até o final do tempo de seguimento (pelo menos 465 dias) e 12/16 (75%) tiveram sobrevida de pelo menos um ano (365 dias), evidenciando dados semelhantes aos 70% encontrados em outro trabalho [18] e reforçando a boa resposta ao tratamento clínico com trilostano. Um estudo retrospectivo evidenciou que a falta de tratamento de cães com HAC está associada ao maior risco de morte, quando comparado aos pacientes tratados com trilostano [39].

Assim como no presente estudo, outros associaram o avanço da idade no momento do diagnóstico como um fator de menor tempo de sobrevida no HAC canino [3, 18]. As causas de morte são diversas e não necessariamente relacionadas ao HAC nos cães com a doença. Estudos retrospectivos relacionaram 25,9% a 38,2% das mortes ao HAC em cães com a síndrome [18, 26]. Entre as causas relacionadas à morte pela doença endócrina estão metástases, invasão da veia cava (no caso da doença adrenal-dependente), deterioração física progressiva, sinais neurológicos e tromboembolismo pulmonar [3, 18, 25]. No grupo HAC do presente estudo, dois cães tiveram morte relacionada à neoplasia sem confirmação por necropsia (não podendo ser desconsiderada a possibilidade de associação tumoral ao HAC) e foi feita eutanásia de um cão por deterioração física progressiva associada à doença. O envolvimento cardiorrespiratório é frequentemente citado entre as causas de morte no HAC canino. Apesar de um estudo citar a ocorrência de endocardiose mitral em dois pacientes [18], na maioria dos trabalhos, o diagnóstico cardiorrespiratório não fica definido, sendo citadas doença cardíaca e doença respiratória [18, 52], insuficiência cardíaca e edema pulmonar [3], e dispneia [18, 39].

A dispneia é um sinal associado ao aumento do risco de morte em cães com endocardiose [32]. No entanto, também pode estar presente no HAC canino, uma vez que

este sinal pode ser a manifestação clínica de complicações como tromboembolismo pulmonar [8] e mineralização pulmonar [9]. No grupo HAC do presente estudo, a dispneia foi um sinal clínico com ocorrência significativamente maior nos cães com morte durante o tempo de acompanhamento. Assim, não se pode descartar o envolvimento destas complicações nos cães com dispneia do presente estudo, uma vez que os diagnósticos de tromboembolismo e mineralização pulmonar dependem de técnicas avançadas de diagnóstico por imagem [6, 9, 20, 34] que não foram realizadas.

Para o conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo que investigou a influência da DVM como comorbidade no tempo de sobrevivência em cães diagnosticados com HAC. Apesar do maior percentual de mortalidade durante o tempo de acompanhamento, não houve diferença significativa na curva de sobrevivência entre os grupos HAC e HAC + DVM. A fisiopatologia da insuficiência cardíaca envolve diversos eventos quando a doença é crônica, como nos casos de DVM canina. Dentre estes eventos, é possível citar o envolvimento da aldosterona no remodelamento cardíaco [62]. O fato de ser comum a diminuição da reserva secretora de aldosterona em cães recebendo trilostano [50] é um fator que poderia estar associado a uma redução do remodelamento cardíaco em cães tratando o HAC. O efeito benéfico da inibição farmacológica da síntese de aldosterona já foi sugerido em ratos com insuficiência cardíaca [19]. Para investigar esta hipótese, seria interessante a comparação com um grupo de cães apenas com DVM e sem HAC.

Um estudo retrospectivo evidenciou a hiperfosfatemia como um achado comum e relacionado ao menor tempo de sobrevivência em cães com HAC. No presente estudo, este achado foi verificado em 4/16 (25%) dos cães com HAC, porém, não houve diferença significativa nas concentrações de fósforo entre os pacientes que permaneceram vivos até o

final do tempo de seguimento e os que morreram antes do final do estudo. Diferenças nos parâmetros laboratoriais dos cães com HAC que morreram antes do final do estudo, como decréscimo de hemoglobina, CHCM, linfócitos e albumina, podem simplesmente estar relacionadas à idade destes pacientes que foi significativamente mais alta, uma vez que estas alterações são comuns em cães geriátricos [45]. Apesar de possivelmente estarem relacionadas ao avanço da idade, é justificável o fato de algumas destas alterações estarem relacionadas a um menor tempo de sobrevida, uma vez que a linfopenia pode estar associada à imunossupressão e a hipoalbuminemia a disfunções hepáticas e renais. A menor concentração de triglicerídeos no grupo de pacientes que morreram durante o estudo, comparada com os pacientes vivos até o final do acompanhamento, não era um resultado esperado, uma vez que a hipertrigliceridemia é um achado importante que pode estar relacionado a complicações metabólicas e aterosclerose [30].

Apesar de maiores dimensões ecocardiográficas em medidas como diâmetro de átrio esquerdo, diâmetro de artéria aorta e espessura de septo interventricular nos cães que morreram antes do final do presente estudo, estas são alterações que podem estar relacionadas à maior média de peso destes pacientes, uma vez que os valores de referência para medidas ecocardiográficas variam de acordo com o porte do animal [10]. A maior espessura do SIV pode estar relacionada ao remodelamento cardíaco causado pelo HAC [13, 44], hipótese que demandaria estudos associando a sobrevida, diagnóstico por imagem e histopatologia do coração de cães com HAC para uma melhor investigação.

O presente estudo conclui que a idade avançada no momento do diagnóstico foi o principal parâmetro relacionado à menor sobrevida na população de cães com HAC avaliada, possivelmente associado a alterações laboratoriais, como linfopenia. Ainda, o

trabalho sugere que as medidas ecocardiográficas e a hipertensão arterial sistêmica, apesar de comum, não interferiram no tempo de sobrevivência dos pacientes com HAC, no entanto, a dispneia no momento do diagnóstico foi um sinal clínico associado a pior prognóstico. Por fim, é possível concluir a degeneração valvar mitral é uma comorbidade comum em cães com HAC, todavia, não foi evidenciada sua interferência na expectativa de vida de animais com a doença endócrina na população estudada.

REFERÊNCIAS

1. Acierno, M.J., Brown, S., Coleman, A.E., Jepson, R.E., Papich, M., Stepien, R.L. and Syme, H.M. 2018. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* **32**: 1803-1822.
2. Arenas, C., Melián, C. and Pérez-Alenza, M.D. 2013. Evaluation of 2 trilostane protocols for the treatment of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism: twice daily versus once daily. *J. Vet. Intern. Med.* **27**: 1478-1485.
3. Arenas, C., Melián, C. and Pérez-Alenza, M.D. 2014. Long-term survival of dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism: a comparison between mitotane and twice daily trilostane treatment. *J. Vet Intern. Med.* **28**: 473-480.
4. Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Häggström, J., Hamlin, R., Keene, B., Luis-Fuentes, V. and Stepien, R. 2009. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Canine Chronic Valvular Heart Disease. *J. Vet. Intern. Med.* **23**: 1142-1150.
5. Avenatti, E., Rebellato, A., Iannaccone, A., Battocchio, M., Dassie, F., Veglio, F., Milan,

- A. and Fallo, F. 2017. Left ventricular geometry and 24-h blood pressure profile in Cushing's syndrome. *Endocrine* **55**: 547-554.
6. Bannas, P., Bell, L.C., Johnson, K.M., Schiebler, M.L., François, C.J., Motosugi, U., Consigny, D., Reeder, S.B. and Nagle, S.K. 2016. Pulmonary Embolism Detection with Three-dimensional Ultrashort Echo Time MR Imaging: Experimental Study in Canines. *Radiology* **278**: 413-421.
7. Barker, E.N., Campbell, S., Tebb, A.J., Neiger, R., Herrtage, M.E., Reid, S.W. and Ramsey, I.K. 2005. A comparison of the survival times of dogs treated with mitotane or trilostane for pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* **19**: 810-815.
8. Behrend, E.N., Kooistra, H.S., Nelson, R., Reusch, C.E. and Scott-Moncrieff, J.C. 2013. Diagnosis of spontaneous canine hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM consensus statement (small animal). *J. Vet. Intern. Med.* **27**: 1292-304.
9. Berry, C.R., Hawkins, E.C., Hurley, K.J. and Monce, K. 2000. Frequency of pulmonary mineralization and hypoxemia in 21 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* **14**: 151-156.
10. Boon, J.A. 2011. Veterinary echocardiography, 2nd ed., Wiley-Blackwell, Oxford.
11. Brown, S., Atkins, C., Bagley, R., Carr, A., Cowgill, L., Davidson, M., Egner, B., Elliott, J., Henik, R., Labato, M., Littman, M., Polzin, D., Ross, L., Snyder, P. and Stepien, R. 2007. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* **21**: 542-558.
12. Burt, M.G., Gibney, J., Ho, K.K.Y. 2007. Protein metabolism in glucocorticoid excess:

study in Cushing's syndrome and the effect of treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**: E1426-1432.

13. Chen, H., Lien, Y. and Huang, H. 2014. Assessment of left ventricular function by two-dimensional speckle-tracking echocardiography in small breed dogs with hyperadrenocorticism. *Acta Vet. Scand.* **56**: 1-10.

14. Chetboul, V. and Tissier, R. 2012. Echocardiographic assessment of canine degenerative mitral valve disease. *J. Vet. Cardiol.* **14**: 127-148.

15. Cho, K.D., Kang, J.H., Chang, D., Na, K.J. and Yang, M.P. 2013. Efficacy of low- and high-dose trilostane treatment in dogs (< 5 kg) with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* **27**: 91-98.

16. Faggiano, A., Pivonello, R., Spiezia, S., De Martino, M.C., Filippella, M., Di Somma, C., Lombardi, G. and Colao, A. 2003. Cardiovascular risk factors and common carotid artery caliber and stiffness in patients with Cushing's disease during active disease and 1 year after disease remission. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**: 2527-2533.

17. Fallo, F., Maffei, P., Dalla Pozza, A., Carli, M., Della Mea, P., Lupia, M., Rabbia, F. and Sonino, N. 2009. Cardiovascular autonomic function in Cushing's syndrome. *J. Endocrinol. Invest.* **32**: 41-45.

18. Fracassi, F., Corradini, S., Floriano, D., Boari, A., Aste, G., Pietra, M., Bergamini, P.F. and Dondi, F. 2015. Prognostic factors for survival in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism treated with trilostane. *Vet. Rec.* **176**: 49.

19. Furuzono, S., Meguro, M., Miyauchi, S., Inoue, S., Homma, T., Yamada, K., Tagawa,

- Y., Nara, F., Nagayama, T. 2017. A novel aldosterone synthase inhibitor ameliorates mortality in pressure-overload mice with heart failure. *Euro. J. Pharmacol.* **795**: 58-65.
20. Goggs, R., Chan, D.L., Benigni, L., Hirst, C., Kellett-Gregory, L. and Fuentes, V.L. 2014. Comparison of computed tomography pulmonary angiography and point-of-care tests for pulmonary thromboembolism diagnosis in dogs. *J. Small. Anim. Pract.* **55**: 190-197.
21. González, F.H.D., Corrêa, M.N. and Da Silva, S.C. 2014. Transtornos metabólicos dos animais domésticos, 2nd ed., Editora UFRGS, Porto Alegre.
22. Goy-Thollot, I., Péchereau, D., Kéroack, S., Dezempte, J.C. and Bonnet, J.M. 2002. Investigation of the role of aldosterone in hypertension associated with spontaneous pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Small Anim. Pract.* **43**: 489-492.
23. Griebisch, C., Lehnert, C., Williams, G.J., Failing, K. and Neiger, R. 2014. Effect of trilostane on hormone and serum electrolyte concentrations in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* **28**: 160-165.
24. Hattersley, A.T., Meeran, K., Burrin, J., Hill, P., Shiner, R. and Ibbertson, H.K. 1994. The effect of long- and short-term corticosteroids on plasma calcitonin and parathyroid hormone levels. *Calcif. Tissue. Int.* **54**: 198-202.
25. Helm, J.R., McLauchlan, G., Boden, L.A., Frowde, P.E., Collings, A.J., Tebb, A.J., Elwood, C.M., Herrtage, M.E., Parkin, T.D. and Ramsey, I.K. 2011. A comparison of factors that influence survival in dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism treated with mitotane or trilostane. *J. Vet. Intern. Med.* **25**: 251-260.
26. Hoffman, J.M., Lourenço, B.N., Promislow, D.E.L. and Creevy, K.E. 2018. Canine

hyperadrenocorticism associations with signalment, selected comorbidities and mortality within North American veterinary teaching hospitals. *J. Small Anim. Pract.* **59**: 681-690.

27. Hurley, K.G. and Vaden, S.L. 1998. Evaluation of urine protein content in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **212**: 369-373.

28. International Renal Interest Society guidelines. 2017. www.iris-kidney.com. Acessado em 05 de fevereiro de 2019.

29. Iuchi, T., Akaike, M., Mitsui, T., Ohshima, Y., Shintani, Y., Azuma, H. and Matsumoto, T. 2003. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* **92**: 81-87.

30. Jericó, M.M., De Camargo Chiquito, F., Kajihara, K., Moreira, M.A., Gonzales, R., Machado, F.L., Nunes, V.S., Catanozi, S. and Nakandakare, E.R. 2009. Chromatographic analysis of lipid fractions in healthy dogs and dogs with obesity or hyperadrenocorticism. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**: 203-207.

31. Kamenický, P., Redheuil, A., Roux, C., Salenave, S., Kachenoura, N., Raissouni, Z., Macron, L., Guignat, L., Jublanc, C., Azarine, A., Brailly, S., Young, J., Mousseaux, E. and Chanson, P. 2014. Cardiac structure and function in Cushing's syndrome: a cardiac magnetic resonance imaging study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**: E2144-53.

32. Kim, H., Han, S., Song, W., Kim, B., Choi, M., Yoon, J. and Youn, H. 2017. Retrospective study of degenerative mitral valve disease in small-breed dogs: survival and prognostic variables. *J. Vet. Sci.* **18**: 369–376.

33. Lemetayer, J. and Blois, S. 2018. Update on the use of trilostane in dogs. *Can. Vet. J.*

59: 397–407.

34. Marschner, C.B., Kristensen, A.T., Rozanski, E.A., McEvoy, F.J., Kühnel, L., Taeymans, O., Laforcade, A., Sato, A.F. and Wiinberg, B. 2017. Diagnosis of canine pulmonary thromboembolism by computed tomography and mathematical modelling using haemostatic and inflammatory variables. *Vet. J.* **229**: 6-12.

35. Marti, C.N., Gheorghiade, M., Kalogeropoulos, A.P., Georgiopoulou, V.V., Quyyumi, A.A. and Butler, J. 2012. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**: 1455-1469.

36. Mazzi, A., Fracassi, F., Dondi, F., Gentilini, F. and Famigli Bergamini, P. 2008. Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Vet. Res. Commun.* **32**: S299-301.

37. Miceli, D.D., Cabrera Blatter, M.F., Gallelli, M.F., Pignataro, O.P. and Castillo, V.A. 2014. Involvement of glucagon-like peptide 1 in the glucose homeostasis regulation in obese and pituitary-dependent hyperadrenocorticism affected dogs. *Res. Vet. Sci.* **97**:211-217.

38. Mori, A., Lee, P., Izawa, T., Oda, H., Mizutani, H., Koyama, H., Arai, T. and Sako, T. 2009. Assessing the immune state of dogs suffering from pituitary gland dependent hyperadrenocorticism by determining changes in peripheral lymphocyte subsets. *Vet. Res. Commun.* **33**: 757-769.

39. Nagata, N., Kojima, K. and Yuki, M. 2017. Comparison of Survival Times for Dogs with Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism in a Primary-Care Hospital: Treated with Trilostane versus Untreated. *J. Vet. Intern. Med.* **31**: 22-28.

40. Nelson, R.W. 2015. Doenças da adrenal. pp. 824-843. In: Medicina Interna de Pequenos Animais, 5th ed. (Nelson, R.W. and Couto, C.G. eds.), Elsevier, Rio de Janeiro.
41. Novellas, R., De Gopegui, R.R. and Espada, Y. 2008. Determination of renal vascular resistance in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Vet. Rec.* **163**: 592-596.
42. Nozawa, S., Oda, H., Akiyama, R., Ueda, K., Saeki, K., Shono, S., Maruyama, N., Murata, A., Tazaki, H., Mori, A., Momota, Y., Azakami, D., Sako, T. and Ishioka, K. 2014. Decreased gene expressions of insulin signal molecules in canine hyperadrenocorticism. *J. Vet. Med. Sci.* **76**: 1177-1182.
43. Ortega, T.M., Feldman, E.C., Nelson, R.W., Willits, N. and Cowgill, L.D. 1996. Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Sci.* **209**: 1724-1729.
44. Oui, H., Jeon, S., Lee, G., Park, S., Cho, K.O. and Choi, J. 2015. Tissue Doppler and strain imaging of left ventricle in Beagle dogs with iatrogenic hypercortisolism. *J. Vet. Sci.* **16**: 357-365.
45. Pati, S., Panda, S.K., Acharya, A.P., Senapati, S., Behera, M. and Behera, S.S. 2015. Evaluation of geriatric changes in dogs. *Vet. World* **8**: 273-278.
46. Peterson, M.E. 2007. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* **22**: 2-11.
47. Pöppel, A.G., Coelho, I.C., Silveira, C.A., Moresco, M.B. and Carvalho, G.L. 2016. Frequency of endocrinopathies and characteristics of affected dogs and cats in southern Brazil. *Acta Sci. Vet.* **44**: 1379.

48. Prázný, M., Jezková, J., Horová, E., Lazárová, V., Hána, V., Kvasnicka, J., Pecen, L., Marek, J., Skrha, J. and Krsek, M. 2008. Impaired microvascular reactivity and endothelial function in patients with Cushing's syndrome: influence of arterial hypertension. *Physiol. Res.* **57**: 13-22.
49. Radin, J. 2015. Avaliação laboratorial dos lipídios. pp. 1020-1052. In: Hematologia e bioquímica clínica veterinária, 2nd ed. (Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R.W. and Campbell, T.W. eds), Roca, São Paulo.
50. Reid, L.E., Behrend, E.N., Martin, L.G., Kemppainen, R.J., Ward, C.R., Lurye, J.C., Donovan, T.C. and Lee, H.P. 2014. Effect of Trilostane and Mitotane on Aldosterone Secretary Reserve in Dogs with Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* **28**: 443–450.
51. Ruckstuhl, N.S., Nett, C.S. and Reusch, C.E. 2002. Results of clinical examinations, laboratory tests, and ultrasonography in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Am. J. Vet. Res.* **63**: 506-512.
52. Smets, P.M., Lefebvre, H.P., Meij, B.P., Croubels, S., Meyer, E., Van de Maele, I. and Daminet, S. 2012. Long-term follow-up of renal function in dogs after treatment for ACTH-dependent hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* **26**: 565-574.
53. Smets, P.M., Lefebvre, H.P., Kooistra, H.S., Meyer, E., Croubels, S., Maddens, B.E., Vandenabeele, S., Saunders, J.H. and Daminet, S. 2012. Hypercortisolism affects glomerular and tubular function in dogs. *Vet. J.* **192**: 532-534.

54. Soares, F.A.C., Neuwald, E.B., Mombach, V.S., D'Avila, E.R.A., Conrado, F.O. and González, F.H.D. 2012. Systolic blood pressure of dogs at hospital and domestic environment. *Ciência Rural* **42**: 1243-1248.
55. Soares, F.A.C., Matheus, J.P., Carvalho, G.L., Neuwald, E.B., Pöppel, A.G., Valle, S.F. and González, F.H.D. 2016. Cardiocirculatory, biochemical and hemostatic evaluation of dogs with hyperadrenocorticism at diagnosis and after treatment. *Korean J. Vet. Res.* **56**: 161-166.
56. Solter, P.F., Hoffmann, W.E., Hungerford, L.L., Peterson, M.E. and Dorner, J.L. 1993. Assessment of corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **203**: 534-538.
57. Summerfield, N. 2018. Simplifying mitral valve disease diagnostics. *In Practice* **40**: 7-11.
58. Takano, H., Kokubu, A., Sugimoto, K., Sunahara, H., Aoki, T. and Fijii, Y. 2015. Left Ventricular structural and functional abnormalities in dogs with hyperadrenocorticism. *J. Vet. Cardiol.* **17**: 173-181.
59. Tebb, A.J., Arteaga, A., Evans, H. and Ramsey, I.K. 2005. Canine hyperadrenocorticism: effects of trilostane on parathyroid hormone, calcium and phosphate concentrations. *J. Small Anim. Pract.* **46**: 537-542.
60. Teske, E., Rothuizen, J., De Bruijne, J.J. and Rijnberk, A. 1989. Corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme in the diagnosis of canine hypercorticism. *Vet. Rec.* **125**: 12-14.

61. Tilley, L.P. 1992. Essentials of canine and feline electrocardiography, 3rd ed., Lea & Febiger, Philadelphia.
62. Ware, W.A. 2015. Distúrbios do sistema cardiovascular. pp. 1-216. In: Medicina Interna de Pequenos Animais, 5th ed. (Nelson, R.W. and Couto, C.G. eds.), Elsevier, Rio de Janeiro.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho reforça o papel do hiperadrenocorticismo como uma das doenças de maior ocorrência na rotina médica canina, uma vez que, no período de um ano em que os pacientes foram recrutados, 25 cães foram encaminhados para o projeto. Além dos cães com HAC incluídos no estudo, outros diagnosticados com a doença no período de recrutamento deixaram de participar por não atenderem os critérios de inclusão e/ou pela falta de disponibilidade dos tutores. Dentro deste contexto, a degeneração valvar mitral se destacou como uma comorbidade de ocorrência relevante nos cães com HAC, uma vez que em 36% dos animais encaminhados para avaliação com diagnóstico recente da doença endócrina foi descoberta também esta cardiopatia. Sabendo que muitos pacientes com DVM podem ser assintomáticos, estes dados reforçam a importância da atenção que deve ser destinada a avaliação cardiovascular em cães com HAC, principalmente aqueles de pequeno porte e idade avançada.

O acompanhamento dos pacientes pelo período de até 766 dias mostrou o quanto é desafiador determinar o valor prognóstico de parâmetros clínicos, laboratoriais e cardiovasculares no hiperadrenocorticismo, devido à diversidade de alterações sistêmicas e diferentes complicações associadas à doença. Apesar de prejudicar a melhor análise de dados voltados para o prognóstico, o percentual de mortalidade reduzido, mesmo com razoável tempo de acompanhamento, evidencia que a abordagem terapêutica do HAC

canino é bastante satisfatória atualmente, principalmente quando são observados engajamento e colaboração dos tutores no tratamento de seus animais.

Os dados analisados sugerem que existe estresse oxidativo no HAC canino, a partir dos resultados que evidenciaram a presença de peroxidação lipídica no momento do diagnóstico. Felizmente, o tratamento clínico com o trilostano, o fármaco de eleição para cães com a doença, parece ser o suficiente para reverter esta alteração. Por outro lado, não foi possível evidenciar correlações entre a mensuração de TBARS e parâmetros cardiovasculares, como a pressão arterial sistólica e a espessura ventricular esquerda. Assim, as dúvidas sobre a fisiopatologia da hipertensão arterial e do remodelamento cardíaco no HAC permanecem, e novos estudos incluindo a mensuração de diferentes parâmetros que avaliem o estresse oxidativo serão necessários em busca de tais respostas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

AINSCOUGH, J.F.; DRINKHILL, M.J.; SEDO, A.; et al. Angiotensin II type-1 receptor activation in the adult heart causes blood pressure-independent hypertrophy and cardiac dysfunction. **Cardiovascular Research**, v.81:592-600, 2009.

BEHREND, E.N. Canine hyperadrenocorticism. In: FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W.; REUSCH, C.E. **Canine and Feline Endocrinology**. 4.ed. St. Louis, Saunders, p.377-444, 2015.

BOCK, T.N.; PÖPPL, A.G. Canine hyperadrenocorticism enviromental risk factors: a case-control study. **ACVIM Proceedings**, Seattle, Washington, p.76, 2018.

BORGHERESI, R.A.M.B. Peptídeos: angiotensinas, endotelinas e cininas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 19, p. 229-238.

CHOI, J.; KIM, H.; YOON, J. Ultrasonographic adrenal gland measurements in clinically normal small breed dogs and comparison with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.73(8):985-989, 2011.

CONNELL, J.M.; MACKENZIE, S.M.; FREEL, E.M.; et al. A lifetime of aldosterone excess: long-term consequences of altered regulation of aldosterone production for cardiovascular function. **Endocrine Reviews**, v.29:133-154, 2008.

CURTIS, A.O. **Parâmetros de estresse oxidativo em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose**. 60p. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária – Área de Concentração em Clínica Médica. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

DA SILVA, A.S.; MUNHOZ, T.D.; FARIA, J.L.M.; et al. Increase nitric oxide and oxidative stress in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis*: Effect on the pathogenesis of the disease. **Veterinary Microbiology**, v.164:366-369, 2013.

DOUGLASS J.P.; BERRY, C.R.; JAMES, S. Ultrasonographic adrenal gland measurements in dogs without evidence of adrenal disease. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.38(2):124-130, 1997.

DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOODI, H.; et al. Ultrasonographic adrenal gland measurements in clinically normal small breed dogs and comparison with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Free Radical Biology and Medicine**, v.15(4):353-363, 1993.

FRANÇA, R.T.; DA SILVA, A.S.; COSTA, M.M.; et al. Relationship between oxidative stress and clinical-pathological aspects in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Research in Veterinary Science**, v.93(3):1309-1313, 2012.

FRASER, R.; DAVIES, D.L.; CONNELL, J.M.C. Hormones and hypertension. **Clinical Endocrinology**, v.31, p.701-746, 1989.

HANSEN, K.S.; ZWINGENBERGER, A.L.; THÉON, A.P.; et al. Long-term survival with stereotactic radiotherapy for imaging-diagnosed pituitary tumors in dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, 1-14, 2018.

HANSON, J.M.; VAN'T HOOFD, H.M.; VOORHOUT, G.; et al. Efficacy of transsphenoidal hypophysectomy in treatment of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19(5):687-694, 2005.

HARE, J.M. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. **Circulation Research**, v.89(3):198-200, 2001.

JIMÉNEZ PELÁEZ, M.; BOUVY, B.M.; DUPRÉ, G.P. Laparoscopic adrenalectomy for treatment of unilateral adrenocortical carcinomas: technique, complications, and results in seven dogs. **Veterinary Surgery**, v.37(5):444-453, 2008.

KOGIKA, M.M.; LUSTOZA, M.D.; HAGIWARA, M.K.; et al. Evaluation of oxidative stress in the anemia of dogs with chronic kidney disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v.44(1):70-78, 2015.

LANG, J.M.; SCHERTEL, E.; KENNEDY, S.; et al. Elective and emergency surgical management of adrenal gland tumors: 60 cases (1999-2006). **Journal of American**

Animal Hospital Association, v.47:428, 2011.

MAGIAKOU, M.A.; MASTORAKOS, G.; ZACHMAN, K., et al. Blood pressure in children and adolescents with Cushing's syndrome before and after surgical cure. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, p.1734-38, 1997.

MARÇAL, M.; SILVA, C.C.; MARTINS, S.F.M.; CARVALHO, G.L.; JESUS, L.; PÖPPL, A.G. Avaliação do perfil clínico, diagnóstico e resposta ao tratamento médico em cães com hiperadrenocorticismo: 122 casos: 2007 a 2016. Anais do 3º Congresso Internacional da Associação Brasileira de Endocrinologia Veterinária, Guarujá, São Paulo, p.63, 2017.

MARTINS, F.S.M. **Estudos de casos em série e proposta de um índice diagnóstico para o hiperadrenocorticismo canino**. 86p. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária da UFRGS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

MASSARI, F.; NICOLI, S.; ROMANELLI, G.; et al. Adrenalectomy in dogs with adrenal gland tumors: 52 cases (2002-2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.239:216, 2011.

MICELI, D.D.; PIGNATARO, O.P.; CASTILLO, V.A. Concurrent hyperadrenocorticism and diabetes mellitus in dogs. **Research in Veterinary Science**, v.115:425-431, 2017.

MOGICATO, G.; LAYSSOL-LAMOUR, C.; CONCHOU, F.; et al. Ultrasonographic evaluation of the adrenal glands in healthy dogs: repeatability, reproducibility, observer-dependent variability, and the effect of bodyweight, age and sex. **Veterinary Record**, v.168(5):130, 2011.

PAPICH, M.G. **Manual Saunders terapêutico veterinário**. Medvet, São Paulo, 774p, 2009.

REINE, N.J. Medical management of pituitary-dependent hyperadrenocorticism: mitotane versus trilostane. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, 22:18-25, 2007.

SANDERS, K.; KOOISTRA, H.S.; GALAC, S. Treating canine Cushing's syndrome: Current options and future prospects. **Veterinary Journal**, v.241:42-51, 2018.

SCHWARTZ, P.; KOVAK, J.R.; KOPROWSKI, A.; et al. Evaluation of prognostic factors in the surgical treatment of adrenal gland tumors in dogs: 41 cases (1999-2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.232:77-84, 2008.

SOARES, F.A.C. **Alterações cardiocirculatórias em cães com hiperadrenocorticismo**. 49p. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária da UFRGS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**, v.524:13-30, 2017.

YIU, K.H.; MARSAN, N.A.; DELGADO, V.; et al. Increased myocardial fibrosis and left ventricular dysfunction in Cushing's syndrome. **European Journal of Endocrinology**, 166:27-34, 2012.

ANEXO A – Carta de aprovação da CEUA/UFRGS

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 31830

Título: VALOR PROGNOSTICO DE PARAMETROS CARDIOVASCULARES E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAES COM HIPERADRENOCORTICISMO

Vigência: 01/11/2016 à 30/03/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

FELIX HILARIO DIAZ GONZALEZ - coordenador desde 01/11/2016
 STELLA DE FARIA VALLE - pesquisador desde 01/11/2016
 ALAN GOMES POPPL - pesquisador desde 01/11/2016
 NELSON ALEXANDRE KRETZMANN FILHO - pesquisador desde 01/11/2016
 Frederico Aécio Carvalho Soares - Aluno de Doutorado desde 01/11/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 31/10/2016 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO - UFRGS-PAULO DA GAMA, 110 BAIRRO FARROUPILHA - em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 54 cães adultos (machos ou fêmeas) provenientes da rotina do Hospital de Clínicas Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 18 de Novembro de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI
 Coordenador da comissão de ética

ANEXO B – Carta de autorização do HCV-UFRGS

HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS

TERMO DE CIÊNCIA E APROVAÇÃO

Venho por meio deste, informar que o Projeto de Pesquisa intitulado: "Valor prognóstico de parâmetros cardiovasculares e de estresse oxidativo em cães com hiperadrenocorticismismo", desenvolvido pelo doutorando Frederico Aécio Carvalho Soares e sob a orientação do Professor Félix Hilário Diaz González, fica autorizado a ser realizado nas dependências deste Hospital, desde que atenda tanto as normas internas de funcionamento do HCV, assim como as determinações específicas da CEUA/UFRGS sobre o uso de animais.

Porto Alegre, junho de 2016.

Stella de Faria Valle
Diretora do HCV/UFRGS

ANEXO C - Termo de consentimento dos tutores

1-Título do projeto: “Valor prognóstico de parâmetros cardiovasculares e de estresse oxidativo em cães com hiperadrenocorticismo”.

2- Objetivos do estudo: Avaliar o valor prognóstico da troponina I e de marcadores de estresse oxidativo em cães com hiperadrenocorticismo (HAC); verificar a interferência de comorbidades como o diabetes mellitus e a endocardiose valvar mitral no prognóstico e expectativa de vida de cães com HAC; definir biomarcadores com valor prognóstico no HAC canino, que possam auxiliar no correto tratamento e aumento da expectativa de vida dos pacientes; avaliar se o remodelamento cardíaco decorrente do hiperadrenocorticismo está relacionado à ocorrência de estresse oxidativo.

3- Procedimentos realizados: os pacientes serão submetidos aos seguintes a aferição de pressão arterial, eletrocardiograma, ecocardiograma e coleta de sangue (todos considerados de grau de severidade leve pelo CEUA-UFRGS). O tutor do animal será convidado a acompanhar presencialmente todos os procedimentos. Os cães serão convidados a fazer esta avaliação no momento do diagnóstico do HAC e, após, a cada seis meses até um período de 1 ano.

4- O proprietário não terá custos com os exames de avaliação cardiocirculatória citados anteriormente, que serão realizados nos momentos pré-determinados.

5- A participação no projeto não isenta o proprietário da consulta e custos com o diagnóstico, acompanhamento e tratamento do HAC.

6- Garantia de acesso em qualquer etapa do estudo: o proprietário do cão terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisa acompanha o tratamento instituído pelo médico veterinário do cão, e não fará nenhum procedimento desnecessário ou que possa causar qualquer tipo de prejuízo para o cão.

7- Responsável pela pesquisa: Frederico Aécio Carvalho Soares (Médico Veterinário, doutorando, Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, UFRGS) telefones: 3308-8033 (Laboratório) ou 8575-5020 (celular).

8- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e

deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição

9- Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

*Declaro ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o presente estudo. Foi discutido com os veterinários responsáveis sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo e os procedimentos a serem realizados. Concordo voluntariamente que meu cão participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Dados do cão:

Nome:

Raça:

Idade:

Assinatura do tutor

Data / /

*Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste representante legal do paciente para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

ANEXO D – Ficha de atendimento dos pacientes

ID projeto: Nome: Ficha HCV:

Raça: Idade: Gênero:

Peso: Data:

Tutor: Telefone:

E-mail:

Méd.Vet. Responsável (endócrino):

- Tratamento atual:

- Sinais clínicos cardiorrespiratórios:

Tosse Dispneia Intolerância ao exercício Síncope Cianose Epistaxe Fraqueza Qualidade do sono? Boa Média Ruim

Ausculta CR:

FC:

PAS:

ECG:

Ecocardio: