

EVALUACIÓN DE LA PROTEINURIA EN PERROS CON ENFERMEDAD DE CUSHING, PREVIO Y POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO Y KETOCONAZOL

Proteinuria evaluation in dogs with cushing disease before and after the treatment with retinoic acid and ketoconazol

Beatriz Martiarena¹, Leticia Madalena², Graciela Mira³, Mercedes Fianza³, José Lalia⁴, Leonardo Ortemberg⁵, Mónica Loiza⁵, Víctor Castillo^{4*}

Hospital Escuela de Medicina Veterinaria, Área Clínica Médica Pequeños. Animales; Unidad ¹ Nefrología; ³ Laboratorio; ⁴ Endocrinología; ⁵ Clínica Médica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires; ² Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Av. Chorroarín 280 (1427), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* Autor para correspondencia: Víctor Castillo. Email: vcastill@fvet.uba.ar

RESUMEN

El hipercortisolismo ha sido señalado como causante de enfermedad renal por compromiso del compartimento glomerular. Su identificación precoz y no invasiva se realiza mediante el estudio cualitativo y cuantitativo de las proteínas urinarias, el primero evalúa el origen y el segundo la magnitud de las pérdidas.

Estudios recientes proponen al ácido retinoico (AR) como una alternativa terapéutica efectiva en el Cushing de origen pituitario al uso de ketoconazol (Ktz) y otras drogas de acción antiesteroideogénica. El presente trabajo se realizó con el propósito de, evaluar la proteinuria en perros con hipercortisolismo pituitario dependiente (HPD), y determinar si la terapia con AR y ktz logran controlarla. Se estudió la proteinuria de 22 perros con HPD, 14 tratados con AR y 8 con Ktz, durante 6 meses. La determinación cuantitativa (técnica de Rojo de Pírogalol) mediante la relación proteína / creatinina urinaria (UP/C) determinó que, en 11/22 (50%) el valor fue anormalmente alto ($\geq 0,51$); en 3/22 (14%) dudoso y 8/22 (36%) tenían valores de proteinuria consideradas normal ($< 0,3$). El estudio cualitativo de la proteinuria (técnica SDS-PAGE) indicó que de los 11 perros con UP/C alta, 3/11 tenían proteinuria glomerular (27,3%), 6/11 glomérulo-tubular (54,54%), y 2 fisiológica o normal (18,18%). Los 3 perros con valores de UP/C dudoso tuvieron, 2 proteinuria glomerular, y 1 fisiológica por el SDS-PAGE. Un perro con UP/C fisiológica tenía proteinuria tubular por el método cualitativo. El total de perros con daño glomerular fue de 11 (50%). Los valores de UP/C persistieron al final del estudio sin cambios notorios y la evaluación estadística entre tratamientos no indicó diferencias significativas. Ningún perro con

proteinuria normal evolucionó hacia la anormalidad, y aquellos que tenían la UP/C alta no modificaron significativamente los valores ni desarrollaron insuficiencia renal. Se concluye que, al momento del diagnóstico, aproximadamente el 50 % de los perros con HPD tendrían daño glomerular, y que el tratamiento específico del Cushing no logra controlar a la enfermedad renal.

Palabras claves: Cushing, proteinuria, enfermedad renal, Ketoconazol, Ácido Retinoico.

ABSTRACT

The hypercortisolism has been considered the originator of the renal disease due to problems in the glomerular compartment. The early and non invasive diagnosis is carried out through the qualitative and quantitative study of the urinary proteins. The qualitative method determines the origin and the quantitative method determines the magnitude of the loss.

Recent studies suggest that the retinoic acid (RA) may be an effective therapeutic alternative for the Pituitary dependent Cushing, instead of the usage of Ketoconazol (Ktz) and other antisteroideogenic drugs. This work was carried out in order to evaluate the proteinuria in dog with Pituitary dependent Hypercortisolism (PDH) and to determine if the therapy with RA and Ktz can control it. The proteinuria was studied in 22 dogs with PDH, 14 of them treated with RA and 8 with Ktz for six months. The quantitative determination (Pyrogallol Red technique) through the relation protein/creatinine (UP/C) showed that in 11/22 (50 %) the value was abnormally high ($> 0,51$), doubtful in 3/22 (14 %) and in 8/22 (36 %) the proteinuria values were considered normal ($< 0,3$). The qualitative study of the proteinuria (SDS-PAGE Technique) showed that out of the 11 dogs with high UP/C values, 3 of them had glomerular proteinuria (27,3 %), 6 glomerulo-tubular (54,54 %), and 2 physiological or normal proteinuria (18,18 %). The 3 dogs with doubtful UP/C values had by the SDS-PAGE, 2 glomerular proteinuria, and 1 physiological. One dog with normal UP/C value had tubular proteinuria by the qualitative method. The total number of dogs with glomerular damage was 11 (50 %). The UP/C values remained the same by the end of the study with no significant changes and the statistic evaluation between the treatments did not show significant differences. Any dog with normal proteinuria became abnormal and those with high UP/C developed renal insufficiency. We conclude that, at the moment of the diagnosis, it is expectable that 50 % of the dogs with DPH have glomerular damage, and that the specific treatment of Cushing does not control the renal disease.

Key words: Cushing, proteinuria, Kidney Disease, Ketoconazole, Retinoic Acid.

INTRODUCCIÓN

El endotelio del capilar glomerular se caracteriza por presentar poros de un tamaño aproximado de 69 Kd y estar recubierto por una sialoproteína con carga eléctrica negativa. Esta estructura de la membrana filtrante determina que el pasaje de las proteínas sea inversamente proporcional al tamaño, forma y carga eléctrica de las moléculas proteicas. La proteinuria es consecuente de enfermedades renales y extrarenales, e independientemente de la causa que la origina son consideradas por sí mismas un agente nefrotóxico responsable de la progresión de la lesión renal, Burton et al. (1996). Los perfiles de excreción varían dependiendo de la causa o del

mecanismo involucrado en el daño renal. Caracterizar la calidad de las proteínas eliminadas, por carga y/o peso molecular, permite no sólo conocer el origen sino que, en el caso que le corresponda al riñón, localizar el compartimento involucrado (glomerular y/o tubular), por lo que son consideradas un importante marcador de lesión renal (Bazzi 2003; Marshal et al. 1998; Zini et al 2004). La determinación cuantitativa de la proteinuria permite determinar la magnitud de las pérdidas (Lulich et al. 1990; Martiarena et al. 2002; Waters et al. 1997).

El hiperadrenocortisolismo ha sido listado como una causa de enfermedad renal en el perro que afecta específicamente al glomérulo (Chen et al. 1998; Waters et al. 1997). Esta aso-

ciación fue establecida por diferentes autores, al encontrarse altos valores de proteinuria, determinados por la relación proteína / creatinina en orina (UP/C), en una tercera parte de pacientes con antecedentes de administración crónica de glucocorticoides o con natural hiperadrenocortisolismo (Hurley et al. 1998; Waters et al. 1997; Ortega et al. 1996). La enfermedad renal por alto corticoide se inicia con un hiperfiltrado que altera la permeabilidad del capilar glomerular a macromoléculas e incrementa la excreción de proteínas, Hurley et al. (1998).

El ácido retinoico (AR) ha sido descrito como tratamiento del Cushing pituitario dependiente; ejerce un efecto inhibitorio de la síntesis de adrenocorticotropina (ACTH) e induce a la apoptosis tumoral (Castillo et al. 2006; Páez-Pareda et al. 2001). Por lo tanto, al actuar sobre el adenoma productor de ACTH logra el descenso del cortisol circulante evitando sus efectos negativos.

El ketoconazol (Ktz) también es indicado como tratamiento del hipercortisolismo dado sus efectos inhibidores de la esteroideogénesis adrenal (Feldman et al. 1990; Sonino et al. 1999). Sin embargo, el control de la secreción de cortisol no es suficiente, debido a la persistente estimulación ejercida por los altos niveles de ACTH circulante, Sonino et al. (1999). De esta forma los efectos negativos del cortisol pueden persistir.

El objetivo del presente estudio fue evaluar en perros con Síndrome de Cushing, originado por el adenoma corticotropo secretante de ACTH (denominado Enfermedad de Cushing o hipercortisolismo o pituitario dependiente, HPD), la presencia de proteínas en orina como indicador de daño renal, y si éste logra ser controlado por el tratamiento indicado del HPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se estudiaron 22 perros (8 machos y 14 hembras) con HPD. La edad promedio de los

animales, tanto en machos y hembras, fue de 9 años (CI: 8.2 - 9.9, rango 3 - 14 años). El Síndrome de Cushing fue sospechado por signos clínicos, y estudios de laboratorio (recuento absoluto de eosinófilos, hepatograma y lipidograma). Su origen hipofisario fue comprobado acorde el siguiente protocolo diagnóstico: 1) incremento de la excreción urinaria de cortisol (evaluado por medio de la relación cortisol/creatinina en orina, RC/C), Rijnberk et al. 1988, con inapropiada elevación de la concentración de ACTH plasmática (Bazzi C. 2003; Castillo et al. 2006), y 2) por disminución de la RC/C a más del 50%, del valor obtenido como basal, luego de suministrar 0,1 mg/kg de dexametasona vía oral, cada 8 horas, Galac et al. 1997. La presencia del adenoma hipofisario (corticotropinoma) se diagnosticó por medio de resonancia nuclear magnética contrastado con gadolinio a los cortes sagital por línea media y coronal.

Los perros seleccionados no tenían otras enfermedades concurrentes que pudieran comprometer la función renal. El descarte de ellas se realizó teniendo en cuenta la anamnesis, examen físico general, estudios bioquímicos, hematológicos, análisis de orina y ultrasonografía abdominal.

Los perros se distribuyeron, al azar en estudio a simple ciego, en dos grupos según el tratamiento recibido:

Grupo A: 14 animales, tratados con AR como isotretinoína 9-cis, dosis de 2 mg/kg/día, Grupo B: 8 animales tratados con Ktz (20 mg/kg/día). El estudio se realizó durante 6 meses.

Procedimiento diagnóstico del Síndrome de Cushing

Se realizaron dos mediciones de ACTH plasmática y de RC/C, al momento del diagnóstico (basal, recipiente 1) y a los 6 meses de tratamiento (final de la experiencia, recipiente 3) (Castillo et al 2006; Reijnberk et al, 1988). La ACTH plasmática se midió por método inmunoradiométrico (Nichols Advantage ACTH Assay, Nichols Institute Diagnostics, Bad Vil-

bel, Germany). El cortisol urinario se midió por radioinmunoanálisis (DPC Corporation, San Diego, California, USA). La creatinina urinaria fue determinada por el método de Picrato Alcalino® BioSystems, mediante sistema automatizado (Metrolab Autoanalyzer Merk).

La inhibición con alta dosis con dexametasona fue efectuada sólo al momento del diagnóstico.

La orina para determinar la RC/C y UP/C fue obtenida por los propietarios, por chorro medio, en domicilio (ambiente sin estrés), al momento del diagnóstico y a los 6 meses de tratamiento, de la siguiente forma: mezcla en un mismo recipiente de alícuotas de 2 ml de las orinas (mantenida refrigerada a 8°C) de cada una de las micciones, segunda del día, de la tarde, última de la noche y la primera del día siguiente. Después de colectar la última muestra de orina del estudio basal (recipiente 1) para el diagnóstico de Síndrome de Cushing, se obtuvo sangre para medir ACTH plasmática, a continuación se indicó suministrar dexametasona 0,1 mg/kg/peso oral cada 8 horas durante todo ese día. Se recolectó la primera orina de la mañana siguiente (recipiente 2). Es indicativo de supresión a la dexametasona cuando la RC/C del recipiente 2 es menor del 50% respecto del recipiente 1, (Rijnberk et al. 1988; Galac et al. 1997).

El coeficiente de variación intra e interensayo para la ACTH fue de 3% y 6,8% respectivamente. Para el cortisol urinario dichos coeficientes de variación fueron de 8% y 5%.

Estudio de las proteínas en orina

Se estudiaron las proteínas urinarias (basal y a los 6 meses del tratamiento), como método no invasivo de marcador de enfermedad renal. Las muestras de orina fueron obtenidas del recipiente 1 mencionado como basal y de una segunda recolección al término del tratamiento, recipiente 3. La creatinina fue medida por el método de Picrato Alcalino® BioSystems, en

mg/dl, y las proteínas con la técnica de precipitación y coloración con Rojo de Pirogalol, Proti U/ LCR® Wiener, en mg/dl. La cuantificación de proteínas en orina se realizó mediante la relación proteína/creatinina (UP/C), considerando como valor normal a menos de 0,3, dudoso entre 0,31 y 0,5 y anormales para los mayores de 0,51, Martiarena et al. (2002). Un ml fue congelado a - 20°C para luego realizar la determinación cualitativa de proteína, mediante la separación de cada una de sus fracciones por peso molecular (PM), efectuado en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio técnica de SDS-PAGE (con coloración argéntica rápida); interpretando como fisiológica o normal a una leve banda de proteínas de PM 69 kd (20 mg/L), como glomerular a las de PM ≥ 69 kd y como tubular a las de PM < 69 kd, figura N° 1 (Marshall et al 1998; Zini et al. 2004).

Análisis Estadístico

Se compararon los valores pre y postratamiento (intra e intergrupo) por el test de Mann-Whitney, siendo significativo $p < 0.05$. Los valores se expresan en promedio \pm SEM.

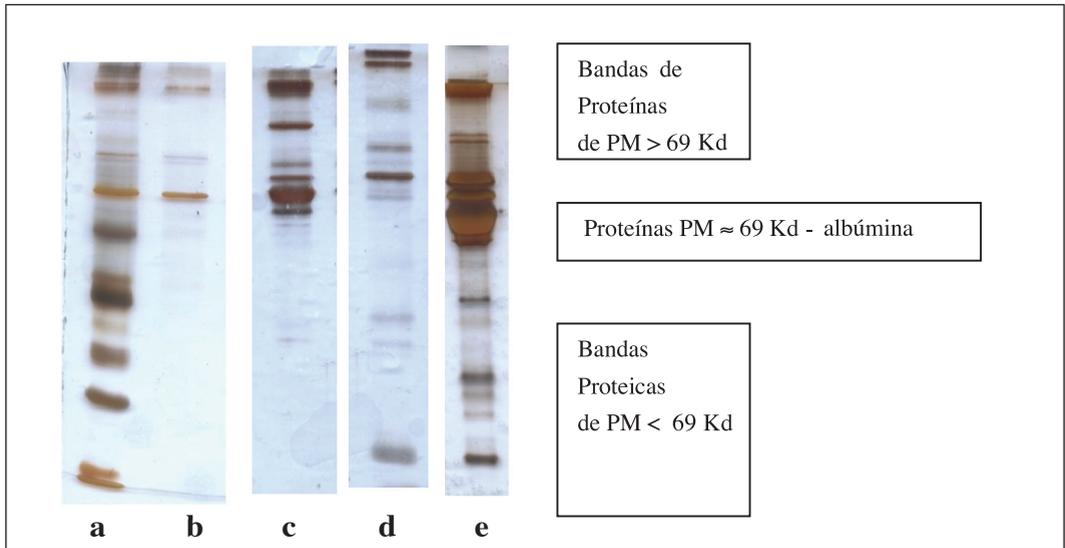
Se correlacionó ACTH vs UP/C y RC/C vs UP/C utilizando el test de correlación de Spearman (basal y pos tratamiento).

El programa estadístico utilizado fue GraphPad Prism, version 3 (GraphPad Software, Inc.).

5) Procedimiento ético con animales de experimentación.

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires y por la Secretaría de Ciencia y Técnica (UBACyT) de la mencionada Universidad (proyecto VO45), adaptándose a las leyes nacionales y normas internacionales vigentes sobre el uso de animales en experimentación y ensayos clínicos. Se obtuvo el consentimiento firmado de los propietarios para realizar el presente estudio.

Figura 1. **Determinación cualitativa de las proteínas en orina por el método de SDS-PAGE.** a) patrón de control, muestra todas las bandas proteica, b) proteinuria fisiológica, se observa una leve banda en la zona de coincidencia con las con las proteínas de PM 69 Kd (albúminas, 20 mg/dl), c) proteinuria glomerular (banda anormal en la zona de coincidencia con las albúminas), y d) proteinuria tubular (bandas en la zona coincidente con las proteínas de PM < 69 Kd) y e) glomérulo-tubular.



RESULTADOS

En la anamnesis no se encontraron datos que pudieran revelar la existencia de enfermedad renal por otra causa a la de la EC. El sedimento urinario carecía de elementos inflamatorios en todos los perros. Los valores de Urea y Creatinina en sangre fueron normales al momento del diagnóstico y al finalizar el estudio. La anormalidad de los datos del hepatograma y la hepatomegalia, detectada por ecografía, fueron hallazgos consistentes y relacionados a la EC. La ultrasonografía determinó cierto aumento en la ecogenicidad cortical y pérdida en la definición corteza/médula en 14 de los 22 perros, dichos hallazgos no correlacionaron significativamente con los valores de proteinuria.

La RC/C y ACTH plasmática (Fig. 2 y Cuadro 1), elevadas al comienzo de la experiencia, disminuyeron significativamente ($p=0,0002$ y $p<0,0001$ respectivamente) a los 6 meses de tratamiento en el grupo tratado con ácido retinoico. En los perros que recibieron el ketoconazol se observó descenso de la RC/C ($p=0,0001$) pero aumento de la ACTH plasmática ($p<0,002$). Pese al descenso de RC/C en el grupo con ketoconazol, ésta relación fue significativamente más elevada ($p=0,012$) respecto a la obtenida en el grupo que recibió ácido retinoico.

La evaluación cuantitativa de las proteínas urinarias, mediante la relación UP/C, de los 22 perros al momento del diagnóstico de EC identificó, 11/22 (50%) con proteinuria anormalmente alta, 3/22 (14%) dudoso y 8/22 (36%) con proteinuria normal.

El estudio cualitativo de la proteinuria indicó que de los 11 perros con proteinuria alta, 3/11 (27,3%) tenían proteinuria glomerular, 6/11 (54,54%) proteinuria glomerulo - tubular, y 2/11 (18,18 %) fisiológica o normal.

La evaluación de la proteinuria de los 3 perros con valores de UP/C dudoso por el método SDS-PAGE determinó, 2 con proteinuria glomerular y 1 con proteinuria fisiológica (UP/C = 0,39). Un perro con valor de UP/C normal tenía proteinuria tubular por el método cualitativo. Por lo tanto la cantidad de perros con proteinuria anormal detectado por SDS-PAGE fue de 12/22. Aunque, el total de perros con proteinuria indicativa de daño glomerular fue de 11/22 (5/22 glomerular y 6/22 glomerulo-tubular).

Si bien se observa una disminución de la relación UP/C pos tratamiento en ambos grupos (Fig 3 y Cuadro 1), ésta no es significativa. La proteinuria patológica se mantiene, aunque, con cierta tendencia a disminuir. No se encontró correlación entre las variables estudiadas.

DISCUSIÓN

Los glucocorticoides pueden ser tóxicos directa o indirectamente al riñón. Ejercen su efecto adverso sobre el glomérulo e inducen a la proteinuria, ésta a su vez tiene un efecto nocivo sobre el riñón (Burton et al. 1996; Chen et al. 1998; Waters et al. 1997). En la lesión por elevada concentración de corticoides se propone a la enfermedad glomerular como mecanismo de la lesión renal; siendo así la albúmina la proteína predominante en la orina (Waters et al. 1997; Zini et al. 2004). De los resultados obtenidos por el SDS-PAGE se desprende que es esperable la presencia de daño renal en un 50% de los perros diagnosticados con EC por compromiso glomerular, y una parte lo combina con daño tubular como posible avance de la enfermedad renal. El análisis cuantitativo, también, arrojó un 50 % de animales con valores de UP/C anormalmente alto. Esta técnica no permite determinar que tipo de proteínas se encuentran en orina, aunque, cuanto mayor es

Cuadro 1. Resultados de ACTH, RC/C y UP/C en perros tratados con ácido retinoico (isotretinoína 9-cis) vs ketoconazol.

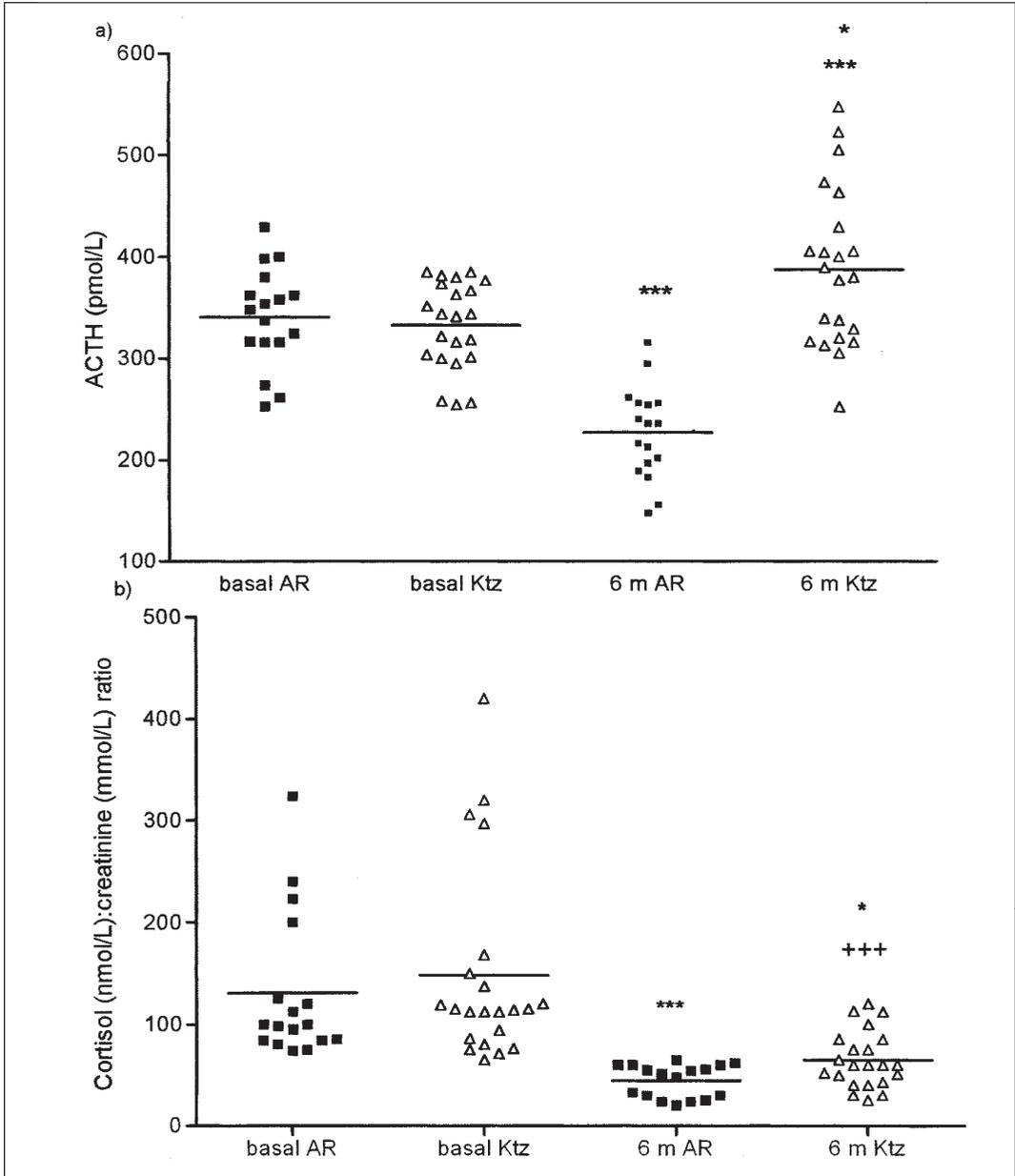
	Ácido Retinoico		Ketoconazol	
	Pre tratamiento	Pos tratamiento	Pre tratamiento	Pos tratamiento
ACTH	390,4± 11,9	226,6 ± 11 ^(a)	332,3 ± 9,2	387,6 ± 16,6 ^(b-c)
RC/C	130,5 ± 17,4	44,5 ± 3,9 ^(d)	148,4 ± 20,5	65,05 ± 5,9 ^(e-f)
U/PC	1,3 ± 0,7	0,9 ± 0,3	1,7 ± 0,6	0,9 ± 0,5

ACTH: ^a P<0,0001 vs AR pretratamiento, ^b P<0,0001 vs AR postratamiento, ^c P<0,002 vs Ktz pretratamiento
 R C/C: ^d P=0,0002 vs AR pretratamiento, ^e P=0,012 vs AR postratamiento, ^f P=0,0001 vs Ktz pretratamiento
 UP/C : no hay diferencias significativas entre los tiempos estudiados y entre los grupos.

Valores expresados como promedio ± SEM, test de Mann-Whitney.

AR: ácido retinoico, Ktz: ketoconazol., RC/C: relación cortisol/creatinina en orina, UP/C: relación proteína/creatinina en orina.

Figura 2. ACTH plasmática (a) y RC/C (b) en perros con Síndrome de Cushing por causa de adenoma productor de ACTH, previo y posterior al tratamiento con ácido retinoico y ketoconazol.

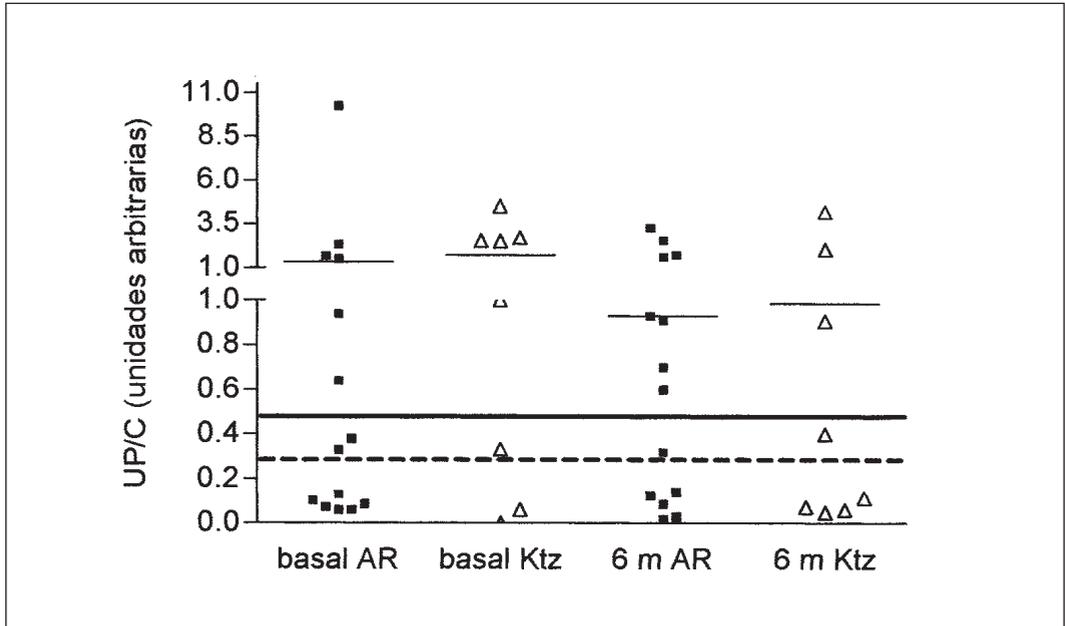


a) *** P=0,0002 vs basal AR; * P<0,002 vs basal Ktz y *** P<0,0001 vs 6 meses AR

b) ***P<0,0001 vs basal AR; +++ P=0,0001 vs basal Ktz y * P=0,012 vs 6 meses AR

Valores expresados como promedio ± SEM, (Mann-Whitney U test)

Figura 3. Variación de la proteinuria en perros con Enfermedad de Cushing previo y posterior al tratamiento con Acido Retinoico y ketoconazol.



La línea punteada indica el valor límite máximo de normalidad, la línea entera es valor a partir del cual se considera francamente patológico. Entre ambos es considerado dudoso.

Valores expresados como promedio \pm SEM. Diferencias no significativas (Mann-Whitney U test)

su valor más se acerca al diagnóstico de daño glomerular, Lulich et al. (1990).

Los valores aportados por la determinación cuantitativa de las proteínas pueden dar falsos positivos y falsos negativos. Esto explicaría los 2 perros con UP/C mayor a 0,51 pero con Proteinuria fisiológica por el SDS-PAGE, y aquel con UP/C normal de 0,17 y proteinuria tubular. Los 2 valores de UP/C obtenidos como dudosos pero con identificación de proteinuria glomerular podrían expresar una fase inicial de la enfermedad renal.

Pese al descenso observado de la RC/C en ambos grupos (y por lo tanto de síntesis de cortisol) el AR controla la EC, con mayor sobrevida y no recurrencia de la enfermedad una

vez suspendido el tratamiento respecto al Ktz, Castillo et al.(2006). El AR inhibe directamente la secreción de ACTH, mientras que el Ktz, al inhibir la síntesis de esteroide, permite que la ACTH continúe siendo secretada por el corticotropinoma, (Feldman et al, 1990), perdiendo la regulación que el cortisol tiene sobre la célula corticotropa, aún la tumoral (Sonino y Boscaro, 1999; Orth, 1995), por lo que los valores de RC/C no descienden de la misma forma que con AR. Este fenómeno ha sido reportado también con el uso del trilostano y el OP'-DDD (Sieber et al, 2006; Orth et al, 1988).

Si bien los tratamientos empleados controlaron la secreción de cortisol, no resolvieron la proteinuria presente en los 11 perros menciona-

dos, durante el período del estudio. Indicando que la lesión renal persistiría pese al control de la enfermedad de base, en particular con el AR. Aunque, dado que ambas afecciones son crónicas, es probable que se necesite mayor tiempo al utilizado en éste estudio para lograr la remisión de la enfermedad renal.

No se puede establecer, a ciencia cierta, si los animales ya tenían proteinuria antes de adquirir la EC, en especial si se considera la edad avanzada de estos perros, en los cuales es factible el desarrollo de enfermedad renal con identidad desconocida. Pero se puede decir, al menos, que la lesión no progresa en forma agresiva, más bien se mantiene con cierta tendencia a disminuir según los valores de UP/C (Fig 3). Los perros con UP/C considerado normal o dudoso no evidenciaron, en los 6 meses que duró el estudio, progresión hacia la anormalidad. Evaluando lo antedicho, sería factible que el daño renal sea consecuencia de la EC o se viese agravada si estaba en forma incipiente. Por lo tanto el control del hipercortisolismo lograría evitar el daño nefrológico glomerular en aquellos animales con proteinuria normal, mientras que, en aquellos que ya lo presentan evitaría la progresión. Si bien ambos tratamientos se han mostrado igualmente efectivos respecto al control de la proteinuria y por lo tanto del daño renal, es necesario remarcar que los perros con ketoconazol tienen recurrencia del Cushing luego de suspendido el medicamento, por lo que sería esperable una progresión del daño renal ante cada recaída.

Proponemos a la evaluación del perfil proteico en orina como herramienta de utilidad clínica con el propósito de identificar la enfermedad renal por compromiso glomerular en perros con EC. El correcto tratamiento de la EC permitiría proteger al riñón de los efectos nefrotóxicos de los glucocorticoides. El AR debería ser el tratamiento de elección por presentar un control mas efectivo del Cushing, Castillo et al, 2006.

BIBLIOGRAFÍA

- BURTON C., HARRIS D. 1996. The rol of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am. J. Kidney Diseases* 27: 765-775.
- BAZZI C. 2003. Composition of proteinuria in primary glomerulonephritides: association with tubulo-interstitial damage, outcome and response to therapy. *G Ital Nefrol.* 20: 346-55.
- CASTILLO V.A., GIACOMINI D.P., PÁEZ-PERED M., STALLA J., LABEUR M., THEODOROPOULOU M., HOLSBOER F., GROSSMAN A., STALLA G., ARZT E. 2006. Retinoic acid as a novel medical therapy for Cushing's disease in dogs. *Endocrinology* 174: 4438-44.
- CHEN ANN, SHEU LAI-FA, HO, YAT-SEN, LIN YU-FENG, CHOU WEI-YUAN, WANG JIS-YI; LEE WEI-HWA. 1998. Administration of Dexamethasone induces proteinuria of Glomerular Origin in mice. *American Journal of Kidney Diseases* Vol. 31, N° 3:443 / 52.
- FELDMAN E.C., BRUYETTE D.S., NELSON R.W. 1990. Plasma cortisol response to ketoconazoles administration in dogs with hyperadrenocorticism. *American Journal of Veterinary Medical Association* 19: 71-8.
- GALAC S, KOOISTRA HS, TESKE E, RIJNBURK A. 1997. Urinary corticoid/creatinine ratios in the differentiation between pituitary-dependent hyperadrenocorticism and hyperadrenocorticism due to adrenocortical tumour in the dog. *Vet Q* 19: 17-20.
- HURLEY K.J., VADEN S.L. 1998. Evaluation of urine protein content in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *JAVMA* 212, N° 3: 369 /73.
- LULICH P., OSBORNE C. 1990. Interpretation of urine Protein - Creatinine radios in dogs with glomerular and nonglomerular disorders. *Continuing Education* Vol. 12, N° 1: 59 / 73.

- MARSHALL T., WILLIAMS K. 1998. Clinical analysis of urinary proteins using high resolution electrophoretic methods. *Electrophoresis* 19: 1752-70.
- MARTIARENA B., MADALENA L., MIRA G., FIDANZA M., MOLINA E., LAMARCA G. 2002. Determinación cuantitativa de proteínas en orina de perros y gatos por el método de Rojo de Pirogalol. Comparación con otras técnicas y estandarización de valores normales en el perro. *Memorias II Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios Especializados en Animales de Compañía de Argentina*, 109.
- ORTEGA T., FELDMAN E., NELSON R., WILLITS N., COWGILL L. 1996. Systemic arterial blood pressure and urine Protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *JAVMA* 209 (19): 1724-8.
- ORTH D.N. 1995, Cushing's Syndrome. *N Eng J Med*, 332: 791-803.
- ORTH D.N, PETERSON M.E. DRUCKER W.D. 1988. Plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptides and cortisol in normal dogs and dogs with Cushing's Syndrome: diurnal rhythm and responses to various stimuli. *Endocrinol*, 122:1250-62.
- PÁEZ-PAREDA M., KOVALOVSKY D., HOPFNER U., THEODOROPOULOU M., PAGOTTO U., UHL E., LOSA M., STALLA J., GRÜBLER Y., MISSALE C., ARZT E., STALLA G. E. 2001. Retinoic acid prevents experimental Cushing syndrome. *Journal Clinical Investigation* 108: 1123 - 31.
- RIJNBEEK A, VAN WEES A, Mol JA1, 988;. Assessment of two tests for the diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Vet Res* 122: 178-80.
- SIEBER-RUCKSTUHL N.S., BORETTI F.S., WENGER M., MASER-GLUTH C., REUSCH C.E. 2006. Cortisol, aldosterone, cortisol precursor, androgen and endogenous ACTH concentrations in dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Dom An Endocrinol*; 31: 63-75
- SONINO N., BOSCARO N., 1999. Medical therapy for Cushing's disease. *Endocrinology Metab. Clinics of North American*. 28: 211-22.
- WATERS C., ADAMS L., SCOTT-MONCRIEFF C., DENICOLA D., SNYDER P., WHITE R., GASPARINI M. 1997. Effects of Glucocorticoid therapy on urine protein - to creatinine ratios and renal morphology in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol 11 N° 3: 172/7.
- ZINI E., BONFANTI U., ZATELLI A. 2004. Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. *Am J Vet Res*. 65 (7): 964-71.