



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

MARCELO ABBÁ MACIOSZEK

**ESTUDO DO SISTEMA NEUROIMUNOENDÓCRINO NA
CAQUEXIA NEOPLÁSICA E DA RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM ESTERÓIDES**

Londrina
2008

MARCELO ABBÁ MACIOSZEK

**ESTUDO DO SISTEMA NEUROIMUNOENDÓCRINO NA
CAQUEXIA NEOPLÁSICA E DA RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM ESTERÓIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco

Londrina
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M152e Macioszek, Marcelo Abbá.

Estudo do sistema neuroimunoendócrino na caquexia neoplásica e da resposta ao tratamento com esteróides / Marcelo Abbá Macioszek. – Londrina, 2008.
97 f. : il.

Orientador: Tânia Longo Mazzuco.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Caquexia – Câncer – Teses. 3. Câncer tratamento – Teses. I. Mazzuco, Tânia Longo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616.092

MARCELO ABBÁ MACIOSZEK

**ESTUDO DO SISTEMA NEUROIMUNOENDÓCRINO NA CAQUEXIA
NEOPLÁSICA E DA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
ESTERÓIDES**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 24 de setembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Jesus Cristo, a Tua vontade é simplesmente perfeita.
Obrigado Senhor, Rei dos reis. Mestre dos mestres.

Aos meus pais, Suzana e João,
pela confiança, apoio e amor incondicionais.

À Karina, minha namorada e futura esposa,
por seu amor e apoio durante todos
os momentos dessa etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Tânia Longo Mazzuco, pela orientação mais que integral e de fundamental importância na contribuição ao trabalho.

À banca examinadora, Prof^a Dr^a Helenir Medri de Souza, Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho e Prof^a Dr^a Tânia Longo Mazzuco pelas valiosas sugestões e contribuições ao trabalho.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pela imensa contribuição para a minha formação científica.

À minha namorada, Karina Garcia Cotrim, por seu amor e imensa contribuição em todos os momentos do trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia, Jesus Antonio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho, pela amizade, companheirismo e ensinamentos laboratoriais durante este trabalho.

Aos colegas da iniciação científica, Gustavo Henrique Grandis, José Francis de Oliveira, Larissa Danielle Bahls, e Nicole de Angelis Sripes pela contribuição imensa ao trabalho.

Aos colegas de mestrado, Andréa Cristine Koishi, Carolina Panis, Fábio Leandro Santos Fenner, Jacqueline Bueno Ferreira, Juliana Laino do Val Carneiro, Juliana Torres Tomazi Fritzen, Roberto Iemitsu Tatakihara, Sérgio Marques Borghi, Tatiane Ferreira Petroni e Thiago Yuiti Castilho Massuda pela amizade e companheirismo durante todo o programa de mestrado.

Aos docentes e colegas Prof. Ms. Jair Tonon, Prof. Ms. Luiz Antonio Custódio e Prof. Ms. Alexandre Yukio Saito pela amizade e companheirismo.

Às suplentes do meu trabalho, Prof^a Dr^a Glaucia Regina Borba Murad e Prof^a Dr^a Maria Angélica Ehara Watanabe.

À Prof^a Dr^a Maria Angélica Ehara Watanabe e Prof. Dr. Mario Sérgio Mantovani pela gentileza e ajuda na realização de algumas atividades e pelo armazenamento e conservação das minhas amostras.

Ao Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa e Prof^a Ms. Maria Emília Favero pela gentileza e ajuda na realização de algumas atividades e utilização do Laboratório de Pós-graduação - HU.

Aos técnicos Carlos Lourenço (Laboratório de Biologia), Nelson Ferreira da Silva (Laboratório de Psicologia) e Maria Lúcia Camillo de Almeida (Laboratório de Anatomia Patológica - HU) pelo imenso auxílio ao trabalho.

À Vânia Darc (Secretaria da pós-graduação em Patologia Experimental) pelo auxílio nas questões burocráticas durante todo o mestrado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a Dr^a Tânia Longo Mazzuco, orientadora de todos os momentos, sempre interessada em discutir meu trabalho e assuntos científicos, dedicada e competente em tudo aquilo que faz. Uma verdadeira mãe científica, que foi fundamental na contribuição para a minha formação acadêmica e científica.

À Karina Garcia Cotrim, minha namorada e amor pra vida toda. Sua participação na realização dos experimentos e outras atividades foi essencial para a finalização do trabalho. Muito obrigado pelo apoio e incentivo durante todo o mestrado.

Ao Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho, um grande amigo que ganhei no mestrado em Patologia Experimental. Foi fundamental para a realização de muitos dos experimentos e atividades. Agradeço por seu espírito científico de pesquisador e pelos ensinamentos das técnicas e procedimentos laboratoriais.

Aos colegas da iniciação científica, Gustavo Henrique Grandis, José Francis de Oliveira, Larissa Danielle Bahls, e Nicole de Angelis Sripes. Agradeço pelo empenho de cada um de vocês durante a realização desse trabalho.

MACIOSZEK, Marcelo Abbá. **Estudo do sistema neuroimunoendócrino na caquexia neoplásica e da resposta ao tratamento com esteróides**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A síndrome da anorexia-caquexia (SAC), de origem multifatorial e complexa, é comum em doenças crônicas, como o câncer avançado. Está associada à perda de peso e diminuição da ingestão alimentar, podendo levar à morte. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da caquexia neoplásica sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o sistema imune, bem como analisar o efeito de medicamentos com ação esteróide utilizados na terapêutica clínica sobre a progressão tumoral e a SAC. Para indução do tumor de Walker-256, 8×10^7 células tumorais (LLC WRC-256) foram inoculadas subcutaneamente em ratos machos Wistar. Animais do grupo controle foram inoculados com 0,5 mL de PBS, em substituição às células tumorais recebidas pelo grupo tumor. A partir do 5º dia da implantação das células até o 10º dia (sacrifício) os ratos receberam um dos seguintes tratamentos: dexametasona em dose antiinflamatória (0,05 mg/Kg/dia via subcutânea, Dex-AI), dexametasona em dose imunossupressora (1 mg/Kg/dia via subcutânea, Dex-IS), megestrol (100 mg/Kg/dia via gavagem, Meg) ou veículo (PBS ou óleo de milho). Foi avaliada diariamente a massa ponderal e consumo de ração dos animais; a aferição da massa tumoral foi feita a partir do 4º dia. No dia do sacrifício foi avaliada a perda de massa corpórea e realização da coleta de sangue para dosagem de corticosterona basal, realização do teste de estímulo com ACTH, dosagem da corticosterona pós-estímulo, dosagem de colesterol e contagem diferencial de leucócitos. Foram dissecados e pesados o tumor, baço, timo, adrenal e hipófise para estudo morfológico e adrenal direita para estudo molecular. Os animais portadores de tumor apresentaram redução do peso a partir do 6º dia, além de redução da ingestão alimentar nos últimos 5 dias ($p < 0,01$) e desenvolvimento de caquexia, confirmando a presença de SAC. Os grupos Dex-AI e Dex-IS apresentaram redução de peso a partir do 7º dia, sem relação com a ingestão alimentar ($p > 0,05$). Somente o tratamento com Dex-IS causou caquexia em ratos não-portadores de tumor. Animais com tumor apresentaram alteração estrutural do timo, neutrofilia ($p < 0,05$), linfopenia ($p < 0,05$) e esplenomegalia ($p < 0,001$), enquanto que somente Dex-AI e Dex-IS preveniram ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) o crescimento do baço; Meg não influenciou no tamanho do baço. Além disso, a presença do tumor causou aumento da adrenal ($p < 0,01$) provavelmente devido à hiperplasia e presença de metástases. Houve diminuição da corticosterona plasmática pós-estímulo por ACTH, resultado da exaustão adrenal pelo estresse crônico; o colesterol plasmático não foi alterado ($p > 0,05$). Ocorreu diminuição da expressão gênica de MC2R (receptor para melanocortina tipo 2) ($p < 0,05$) e 3β HSDI (3β -desidrogenase) ($p < 0,01$) em ratos portadores de tumor, confirmando a exaustão adrenal, enquanto que a expressão de Tspo (proteína translocadora) não foi significativa ($p = 0,052$), apesar da tendência à queda; a expressão gênica de StAR não foi significativa. Somente Dex-AI e Dex-IS preveniram o aumento da adrenal ($p < 0,01$), sugerindo o efeito inibitório dos corticóides sobre o córtex adrenal, além de causar inibição da função adrenal por diminuir as concentrações plasmáticas de

corticosterona basal ($p < 0,05$) e pós-estímulo ($p < 0,01$); Meg não influenciou no tamanho da adrenal. O Meg não apresentou disfunção cortico-adrenal basal, porém houve perda da resposta após o teste de estímulo com ACTH, indicando falha na resposta ao estresse. A variação do peso da hipófise não foi significativa entre os grupos ($p > 0,05$), porém o grupo tumor apresentou redução da porcentagem de células somatotrópicas ($p < 0,01$) e aumento de células tireotrópicas ($p < 0,01$). Adicionalmente, somente Dex-IS foi capaz de prevenir a progressão tumoral, que não ocorreu com o Meg. Esses resultados evidenciam a influência deletéria da SAC sobre o eixo HPA e sistema imune. O conhecimento da fisiopatologia e consequências do uso de drogas esteróides permitem extrapolar nossos dados para o contexto clínico de pacientes com câncer avançado.

Palavras-chave: Caquexia. Câncer. Carcinoma 256 de Walker. Sistema hipófise-supra-renal. Glândulas supra-renais. Glucocorticóides. Dexametasona. Megestrol.

MACIOSZEK, Marcelo Abbá. **Study of the neuroimmunoendocrine system on neoplastic cachexia and response to steroids treatment.** 2008. 95p.
Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The anorexia-cachexia syndrome (ACS), of multifactorial source and complex, is common in chronic diseases, like advanced cancer. Is associated with weight loss and decrease food intake, sometimes causing death. The objective of the present study was to evaluate the influence of neoplastic cachexia over the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and immune system, as well as to analyze the drug effects with steroid action utilized on the clinical therapeutics over the tumoral development and ACS. For Walker-256 tumor induction, 8×10^7 LLC WRC-256 cells were subcutaneously inoculated in Wistar male rats. The control group animals were inoculated with PBS 0,5mL, instead of the tumoral cells received by the tumor group. Starting from 5th day until de 10th day (sacrifice) from the cell inoculation, the rats received the following treatments: anti-inflammatory dexamethasone doses (50 μ g/Kg/day subcutaneous, Dex-AI), immunosuppressor dexamethasone doses (1 mg/Kg/day subcutaneous, Dex-IS), megestrol (100 mg/Kg/day oral, Meg) or vehicle (PBS or corn oil). The body weight and food intake of animals were evaluated daily; the tumoral mass measurement was done starting from the 4th day. At the sacrifice day was assessed the body weight loss and blood was collected for basal corticosterone dosage, as well as performance of stimuli test with ACTH, corticosterone after-stimuli dosage, cholesterol dosage and leucocytes differential count. The tumor, spleen, thymus, adrenal and pituitary were removed and weighted for morphological study and right adrenal for molecular study. The animals bearing tumor presented weight loss starting from 6th day as well as decreased food intake at the last 5 days ($p < 0,01$) and development of cachexia, confirming the presence of ACS. The Dex-AI and Dex-IS groups presented decreased weight starting from 7th day, that was not due to decreased food intake ($p > 0,05$). Only Dex-IS treatment caused cachexia in rats non-bearing tumor. Animals bearing tumor presented structural modification of thymus, increased neutrophils count ($p < 0,05$), decreased lymphocytes count ($p < 0,05$) and increased spleen weight ($p < 0,001$), while only Dex-AI and Dex-IS prevented ($p < 0,05$ and $p < 0,001$) the spleen growth; Meg did not influence on spleen size. Also, the tumor presence caused increased adrenal weight ($p < 0,01$), probably due to, hyperplasia, and metastasis presence. There was decreased of plasmatic corticosterone levels after-stimuli by ACTH, result of adrenal exhaustion because chronic stress; plasmatic cholesterol was not changed ($p > 0,05$). Genic expression reduction of MC2R (melanocortin receptor 2) ($p < 0,05$) and 3 β HSDI (3 β dehydrogenase I) ($p < 0,01$) occurred in rats bearing tumor, confirming adrenal exhaustion, while the Tspo (translocator protein) expression was not significant ($p = 0,052$), in spite of fall tendency; the StAR genic expression was not significant. Only Dex-AI and Dex-IS prevented the adrenal growth ($p < 0,01$), suggesting the inhibitory effect of glucocorticoids over adrenal cortex and causing inhibition of adrenal function by diminishing of basal ($p < 0,05$) and after-stimuli ($p < 0,01$) plasmatic corticosterone levels; Meg did not influence on adrenal size. Meg did not present basal cortical-adrenal disfunction, however there was loss of response after stimuli

test with ACTH, indicating response against stress failure. The pituitary weight was non-significant between the groups ($p > 0,05$), but the tumor group presented reduction of somatotropic cells ($p < 0,01$) and increased thyrotropic cells ($p < 0,01$) percentage. Additionally, only Dex-IS was effective in preventing the tumoral development, that did not occur with Meg. These results show the harmful influence of ACS over the HPA axis and immune system. The knowledgement of pathophysiology and consequences of steroids drugs use allow to extrapolate our data for clinical context in advanced cancer patients.

Keywords: Cachexia. Cancer. Walker 256 carcinoma. Pituitary-adrenal system. Adrenal glands. Glucocorticoids. Dexamethasone. Megestrol.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Regulação da produção de cortisol através do eixo HPA..... | 23 |
| Figura 2 – Hormônios hipofisários e suas ações nos órgãos-alvo..... | 24 |
| Figura 3 – Aspectos moleculares envolvidos na síntese da corticosterona..... | 28 |
| Figura 4 – Glicocorticóides e seus efeitos..... | 30 |
| Figura 5 – Ordem cronológica dos experimentos..... | 36 |
| Figura 6 – Coloração de Hematoxilina&Eosina..... | 49 |
| Figura 7 – Coloração de Alcian blue-PAS-Orange G..... | 50 |
| Figura 8 – Coloração de Tetracrômio de Herlant..... | 51 |
| Figura 9 – Evolução do peso corporal diário (% do peso inicial) de ratos controle e portadores de tumor Walker–256 a partir do dia 0 até o 10º dia após inoculação das células tumorais..... | 53 |
| Figura 10 – Consumo médio de ração de ratos controle e portadores de tumor..... | 54 |
| Figura 11 – Peso do baço relativo ao peso corporal do animal no momento do sacrifício, em ratos controle e portadores de tumor..... | 55 |
| Figura 12 – Quantidade relativa de neutrófilos e linfócitos em ratos controle e portadores de tumor..... | 55 |
| Figura 13 – Cortes histopatológicos do baço de animais do grupo controle (A e B) e tumor (C e D) corados com Hematoxilina & Eosina..... | 56 |
| Figura 14 – Cortes histopatológicos do timo de animais do grupo controle (A e B) e tumor (C e D) corados com Hematoxilina & Eosina..... | 57 |
| Figura 15 – Peso da adrenal relativo ao peso corporal do animal no momento do sacrifício, em ratos controle e portadores de tumor (subtraindo-se o peso do tumor do peso corporal total)..... | 58 |
| Figura 16 – Cortes histopatológicos da adrenal de animais do grupo controle (A e B) e tumor (C e D) corados com Hematoxilina & Eosina..... | 59 |
| Figura 17 – Cortes histopatológicos corados com Hematoxilina & Eosina apresentando metástase no baço (A), timo (B) e adrenal (C) de ratos portadores de tumor Walker-256..... | 60 |
| Figura 18 – Valores de corticosterona plasmática basal (A) e após teste de estímulo com ACTH (B) em ratos controle e portadores de tumor. Elevação da corticosterona plasmática por animal no teste de estímulo do ACTH nos mesmos grupos (C)..... | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 – Concentração de colesterol total plasmático (A); diagrama de dispersão contendo os valores de corticosterona plasmática após o teste de estímulo com ACTH e os valores de colesterol total por animal (B)..... | 62 |
| Figura 20 – Análise da expressão de genes da adrenal relacionados à esteroidogênese | 62 |
| Figura 21 – Porcentagem de células da adeno-hipófise em ratos controle e portadores de tumor avaliadas através de análise combinada das colorações TH e AB-PAS-OG. A) Células produtoras de GH; B) Células produtoras de TSH; C) Células produtoras de prolactina; D) Células produtoras de ACTH | 63 |
| Figura 22 – Evolução do peso corporal diário (% do peso inicial) de ratos portadores de tumor tratados com: veículo, dexametasona em dose antiinflamatória (0,05 mg/Kg, Dex-AI) ou em dose imunossupressora (1mg/Kg, Dex-IS) a partir do dia 5 dia até o 10º dia após inoculação das células tumorais | 64 |
| Figura 23 – Consumo médio de ração de ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI ou Dex-IS | 65 |
| Figura 24 – Curva de progressão do volume tumoral (em %) a partir do 4º dia de inoculação em ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI ou Dex-IS e Meg..... | 66 |
| Figura 25 – Porcentagem de perda de massa corpórea calculada nos animais sob tratamento. A) Efeito do tratamento sobre ratos controle; B) Efeito do tratamento sobre ratos com tumor; C) Diferencial da perda de massa corpórea descontando o efeito do tratamento (B-A) | 67 |
| Figura 26 – Peso do baço relativo ao peso corporal do animal no momento do sacrifício, em ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI ou Dex-IS e Meg (subtraindo-se o peso do tumor do peso corporal total)..... | 69 |
| Figura 27 – Peso da adrenal relativo ao peso corporal do animal no momento do sacrifício, em ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI ou Dex-IS e Meg (subtraindo-se o peso do tumor do peso corporal total) | 70 |

- Figura 28** – Variação da porcentagem de diferentes tipos celulares da adeno-hipófise em grupo de ratos controle tratados com veículo e grupo de ratos tumor tratados com veículo, Dex-AI, Dex-IS ou Meg71
- Figura 29** – Valores de corticosterona plasmática basal (A) e após teste de estímulo com ACTH (B) em ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI, Dex-IS ou Meg72

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Lista de <i>primers</i> utilizados para análise do receptor para ACTH, enzima e co-fatores da esteroidogênese..... | 42 |
| Tabela 2 – Interpretação dos tipos celulares da adeno-hipófise através das colorações de Tetracrômio de Herlant, Alcian-Blue-PAS-Orange G e Hematoxilina & Eosina..... | 45 |
| Tabela 3 – Interpretação da quantidade de células específicas (<i>score</i>) da adeno- Hipófise..... | 48 |
| Tabela 4 – Interpretação das alterações estruturais (<i>score</i>) na análise morfológica do baço | 48 |
| Tabela 5 – Análise histopatológica do baço..... | 69 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

% – por cento

3βHSDI – 3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo I

μg – 10⁻⁶ grama

μL – 10⁻⁶ litro

AB-PAS-OG – Alcian blue-Ácido periódico de Schiff-Orange G

AC – Adenilato ciclase

Ac – Anticorpo

AchE – Acetilcolinesterase

ACTH – Hormônio adenocorticotrófico

ADH – Hormônio anti-diurético

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

AMP – Adenosina monofosfato

AMPc – Adenosina monofosfato cíclica

ANOVA – Análise de Variância Unidimensional

CD4 – Grupo de diferenciação 4

CD8 – Grupo de diferenciação 8

CE – Colesterol-esterase

CEEA – Comitê de ética de experimentação animal

cm³ – Centímetro cúbico

CO – Colesterol-oxidase

CoA – Coenzima A

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

C_t – Comprimento do tumor

Dex-AI – Dexametasona em dose antiinflamatória

Dex-IS Dexametasona em dose imunossupressora

DL 10 – ¹ litro

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNAc – Ácido desoxirribonucléico complementar

EIA – Ensaio imunoenzimático

FSH – Hormônio folículo-estimulante

g – Grama

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GH – Hormônio do crescimento
gmc – Ganho de massa corpórea do grupo controle
GR – Receptor de glicocorticóide
GR α – Receptor de glicocorticóide alfa
GR β – Receptor de glicocorticóide beta
H₂O – água
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HDL – Lipoproteína de alta densidade
H&E – Hematoxilina & Eosina
HMG-CoA redutase – 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase
HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenal
IFN- γ – Interferon - gama
IgG – Imunoglobulina G
IL-1 – Interleucina -1
IL-6 – Interleucina - 6
IL-1 β – Interleucina 1 beta
KCl – Cloreto de potássio
Kg – 10³ grama
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LH – Hormônio luteinizante
L_t – Largura do tumor
MC2R – Receptor para melanocortina tipo 2
Meg – Megestrol
mg – 10⁻³ grama
mie – Massa corpórea inicial do animal com tumor
min – minuto
mL – 10⁻³ litro
mM – 10⁻³ molar
MMLV – *Moloney Murine Leukemia Virus*
mt – Massa do tumor
MyoD – Fator regulador miogênico D
n – Número amostral
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NF-κB – Fator nuclear κB
nm – 10^{-9} metro
nmol – 10^{-9} mol
O₂ – Oxigênio molecular
PAF – Fator de ativação plaquetária
pb – pares de base
PBR – Receptor benzodiazepínico periférico
PBS – Salina tamponada com fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
p_{file} – Profundidade do flanco esquerdo
pH – Potencial hidrogeniônico
PKA – Proteína quinase A
pm – 10^{-12} mol
POD – Peroxidase
PRL – Prolactina
P_t – Profundidade do tumor
RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro
rpm – Rotação por minuto
RT – Transcriptase reversa
SAC – Síndrome da anorexia-caquexia
StAR – Proteína regulatória aguda esteroideogênica
T₃ – Triiodotironina
T₄ – Tiroxina
T.A. – Temperatura de anelamento
TH – Tetracrômio de Herlant
Th1 – Linfócito T *helper* 1
TNF-α – Fator de necrose tumoral - alfa
TSH – Hormônio tireo-estimulante
Tspo – Proteína translocadora
ua – Unidades arbitrárias
UEL – Universidade Estadual de Londrina
V_t – Volume do tumor
WRC – rat, Walker, *carcinoma*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 SÍNDROME DA ANOREXIA – CAQUEXIA | 20 |
| 1.2 CÂNCER AVANÇADO E O EIXO HPA | 22 |
| 1.2.1 Sistema Imune e a Resposta de Estresse..... | 25 |
| 1.3 ASPECTOS MOLECULARES E FUNCIONAIS DO CÓRTEX ADRENAL..... | 26 |
| 1.4 GLICOCORTICÓIDES E SEUS EFEITOS | 28 |
| 1.5 O MEGESTROL NO TRATAMENTO DA ANOREXIA NO CÂNCER AVANÇADO..... | 31 |
| 1.6 JUSTIFICATIVA | 32 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 34 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 34 |
| | |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 ANIMAIS | 35 |
| 3.2 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DE WALKER-256 | 36 |
| 3.3 IMPLANTAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DE WALKER-256..... | 37 |
| 3.4 ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS..... | 37 |
| 3.5 COLETA DE AMOSTRAS..... | 38 |
| 3.6 TESTE DE ESTÍMULO DAS ADRENAIS COM ACTH | 38 |
| 3.7 SACRIFÍCIO E COLETA DE ÓRGÃOS | 38 |
| 3.8 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE CAQUEXIA..... | 39 |
| 3.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA | 39 |
| 3.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL..... | 40 |
| 3.11 ESTUDO MOLECULAR DA GLÂNDULA ADRENAL | 41 |
| 3.11.1 Pesquisa de Seqüência Gênicas e “Primers” | 41 |
| 3.11.2 Extração de RNA..... | 42 |
| 3.11.3 RT-PCR Semi-Quantitativa | 43 |
| 3.12 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO | 43 |
| 3.13 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS | 43 |
| 3.13.1 Colorações Especiais Para a Hipófise..... | 44 |
| 3.13.2 Interpretação dos Cortes Histopatológicos..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 51 |
| 4 RESULTADOS | 53 |
| 4.1 COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS AOS GRUPOS CONTROLE E TUMOR (TRATADOS COM VEÍCULO)..... | 53 |
| 4.1.1 Caracterização da Síndrome de Anorexia-Caquexia..... | 53 |
| 4.1.2 Sistema Imunológico e Caquexia Neoplásica | 54 |
| 4.1.3 Resposta Morfológica e Funcional do Eixo HPA..... | 58 |
| 4.2 EFEITO DO TRATAMENTO DE ANIMAIS COM CAQUEXIA NEOPLÁSICA..... | 64 |
| 4.2.1 Resposta Terapêutica na Evolução do Peso Corporal, Ingestão Alimentar, Progressão Tumoral e Caquexia | 64 |
| 4.2.2 Efeito do Tratamento Sobre o Sistema Imunológico | 68 |
| 4.2.3 Efeito do Tratamento Sobre o Eixo HPA | 70 |
| 5 DISCUSSÃO | 73 |
| 6 CONCLUSÃO | 81 |
| REFERÊNCIAS | 83 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME DA ANOREXIA – CAQUEXIA

A caquexia é uma condição patológica que pode estar presente em diversas doenças crônicas, tais como câncer em estágio avançado, diabetes, cirrose hepática, AIDS, doença de Cronh e insuficiência cardíaca congestiva (TISDALE, 2002; MARTIGNONI et al., 2003). Em pacientes com câncer avançado, a caquexia está presente em 80% dos casos, sendo responsável por 20% das mortes (TISDALE, 2002). Sua frequência pode variar com o tipo de tumor. Em pacientes com leucemia e câncer de mama, por exemplo, a incidência de caquexia é de 40%, enquanto que em câncer de estômago e pâncreas pode chegar a 87% (LOBERG et al., 2007).

Essa desordem metabólica complexa que envolve aspectos de anorexia, lipólise e proteólise leva à perda crônica de massa muscular e tecido adiposo (GONÇALVES et al., 2006). Na caquexia há alterações no metabolismo dos carboidratos, sendo que o consumo de glicose de uma célula tumoral chega a ser de 10 a 50 vezes mais que uma célula normal (MATIAS, 2002; GUPPY et al., 2002). Nesses pacientes, o metabolismo de proteínas e lipídios também está alterado, predominando o catabolismo. Esses fatores estão diretamente relacionados com a perda involuntária de peso (INUI et al., 2002; BERTEVELLO; SEELAENDER, 2001).

A fisiopatologia da caquexia envolve resposta inflamatória, onde algumas citocinas desempenham um papel fundamental. A produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IFN- γ e TNF- α ativam a transcrição de fatores nucleares, como NF- κ B, resultando na diminuição da síntese protéica muscular (GUTTRIDGE et al., 2000). Além disso, a ativação dessas citocinas é responsável pela redução da proteína MyoD, um fator regulador da transcrição de proteínas musculares que age como modulador da sinalização envolvida no desenvolvimento muscular (ACHARYYA et al., 2004).

Alguns hormônios também podem estar envolvidos na fisiopatologia da caquexia. A testosterona, que tem seus níveis diminuídos com o avanço da idade e algumas doenças como o câncer avançado, estimula mioblastos, promovendo

síntese protéica e reparando células musculares lesadas (BHASIN et al., 2003). Além disso, os hormônios adrenais, especialmente os glicocorticóides suprimem a captação de glicose e aminoácidos por células musculares por inibir transportadores celulares. Esses efeitos levam à proteólise e diminuição de síntese protéica, observada na caquexia (EWART, 1998).

Outra apresentação clínica comum em pacientes portadores de câncer é a anorexia, caracterizada pela perda de apetite, saciedade precoce, combinação de ambas ou alteração das preferências alimentares (DAVIS et al., 2004). Sua incidência é cerca de 40% em pacientes com diagnóstico recente, podendo ultrapassar 66% em pacientes terminais (WAITZBERG et al., 2004).

A redução da ingestão alimentar causada pela anorexia, junto com a diminuição involuntária de peso corpóreo por perda de massa muscular e tecido adiposo levam à caquexia. O conjunto de manifestações da caquexia e anorexia leva à chamada síndrome da anorexia-caquexia (SAC). Essa síndrome, de etiologia complexa e multifatorial, não pode ser revertida por simples suplementação alimentar de curto prazo (MACDONALD et al., 2003).

Segundo Waitzberg (2004) mais de 50% dos pacientes com câncer apresentam SAC. Essa síndrome é mais comum em crianças e idosos e seus sintomas estão relacionados com a resposta imune do hospedeiro e características de malignidade do tumor (INUI, 2002). O paciente com SAC pode apresentar maior susceptibilidade a infecções, bem como complicações pós-operatórias e diminuição da tolerância ao tratamento oncológico (CABRAL, 2004; MARTIN, 1999).

O diagnóstico da SAC é feito através da combinação de parâmetros clínicos associados ao câncer, laboratoriais e do peso corpóreo dos pacientes (PINHO et al., 2004; INUI, 2002). Segundo Ferreira (2003) e Inui (2002), a variação de 2% em um mês, 3,5% em três meses e 5% em seis meses é aceitável. A suspeita de caquexia ocorre quando a perda é maior que 5% em seis meses. Uma perda involuntária de 10% já indica depleção severa.

Para o tratamento da SAC, o suporte nutricional aumenta a qualidade de vida do paciente, mas não melhora as taxas de mortalidade associadas aos diversos tipos de câncer. A caquexia nesses pacientes não pode ser revertida apenas com terapia nutricional, pois vários outros fatores além da anorexia interferem no metabolismo levando à perda de peso (JATOI et al., 2004). Agentes β 2 adrenérgicos, inibidores de citocinas e hormônios anabólicos podem ser utilizados

para impedir a excessiva proteólise observada na SAC (ARGILES et al., 2004). Os estimulantes de apetite, como dronabinol e megestrol também são utilizados, sendo este último mais eficiente (JATOI et al., 2002). Por fim, drogas de efeito glicocorticóide, como dexametasona são utilizadas no controle de alguns tipos de câncer, especialmente câncer de mama, próstata e gastro-intestinais (OSBORNE et al., 1979; KEITH, 2008).

1.2 CÂNCER AVANÇADO E O EIXO HPA

A produção de citocinas nas doenças malignas aumenta a produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), um potente agente anorexígeno, que somado com as prostaglandinas, suprime a produção do agente orexígeno neuropeptídeo Y, causando anorexia (INUI, 2002). Pacientes com câncer avançado podem apresentar estresse crônico, que influencia a resposta neuroimunoendócrina através da alteração do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).

O CRH e a vasopressina (ou hormônio anti-diurético: ADH) são produzidos nos núcleos para-ventriculares do hipotálamo e secretados na circulação sanguínea pelo hipotálamo e neuro-hipófise, respectivamente. Esses hormônios agem na hipófise anterior para promover a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH age na camada intermediária do córtex adrenal (zona fasciculada) para produzir os hormônios glicocorticóides, como por exemplo o cortisol (figura 1).

A hipófise, também denominada pituitária, é uma pequena glândula com cerca de 1 cm de diâmetro, pesa 0,5 a 1 g no homem adulto, está situada na sela túrcica, uma cavidade óssea na base do cérebro e está conectada ao hipotálamo pelo pedículo hipofisário. Em ratos adultos, o peso da hipófise varia entre 7 e 14 mg (ANDERSEN, 1935; EWAN, 1975).

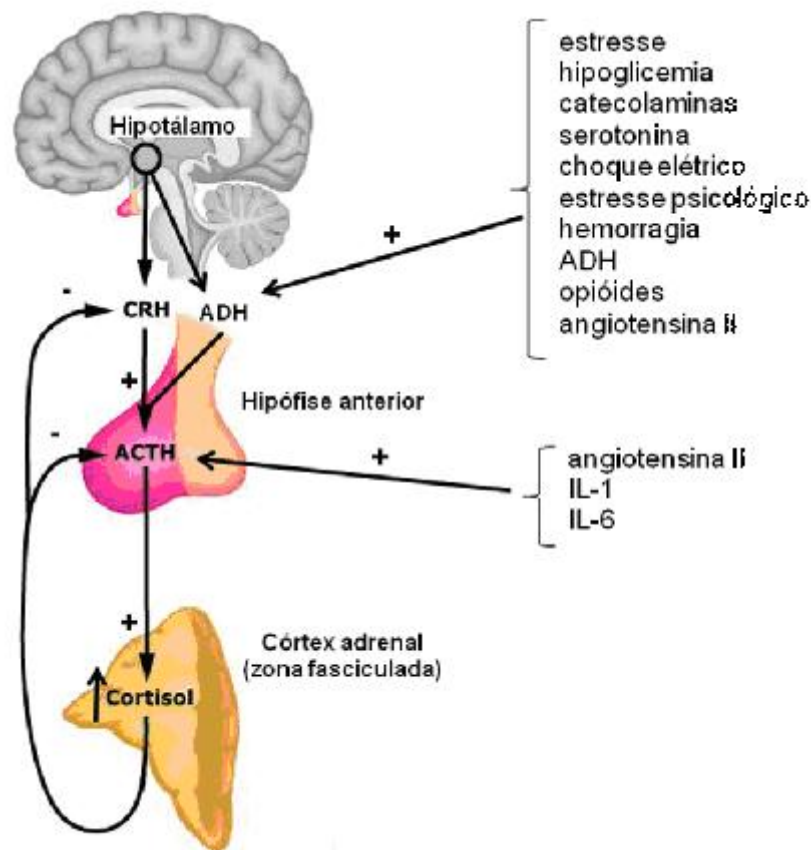


Figura 1 – Regulação da produção de cortisol através do eixo HPA

Essa glândula pode ser dividida em 2 porções distintas: a neuro-hipófise (hipófise posterior) e adeno-hipófise (hipófise anterior), além de uma região intermediária que divide as duas porções denominada de *parte intermédia*, mais desenvolvida em ratos. A neuro-hipófise é responsável pela secreção do hormônio ADH, responsável pelo equilíbrio hídrico-eletrolítico, e ocitocina, que promove a ejeção do leite das glândulas mamárias e auxilia na expulsão do feto no trabalho de parto.

Na adeno-hipófise encontram-se diferentes tipos de células secretoras especializadas na produção de diversos hormônios peptídeos que agem em glândulas-alvo, promovendo efeitos sistêmicos diversos (figura 2). Dentre os hormônios está o GH (hormônio do crescimento), responsável pelo anabolismo protéico, multiplicação e diferenciação celular. Outro hormônio produzido pela glândula é o adenocorticotrófico (ACTH) que regula a secreção de alguns hormônios do córtex adrenal (glicocorticóides) que por sua vez afeta o metabolismo da glicose,

proteínas e gordura. O hormônio tireoestimulante (TSH) regula a secreção dos hormônios T_3 e T_4 pela glândula tireóide que por sua vez controla a velocidade das reações químicas intracelulares do organismo. A prolactina promove o desenvolvimento da glândula mamária e a produção de leite. Os hormônios gonadotróficos denominados folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) agem nas gônadas, controlando o crescimento dos ovários e testículos, bem como suas atividades hormonais e reprodutoras. (PAEZ-PEREDA et al., 2005; KELBERMAN; DATTANI, 2007; STUMPF, 1980).

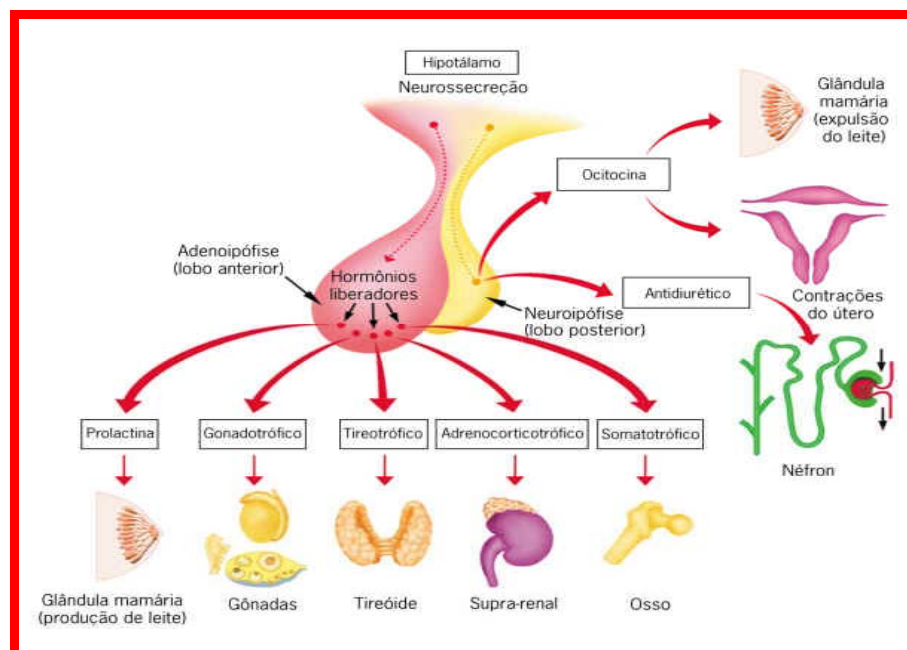


Figura 2 – Hormônios hipofisários e suas ações nos órgãos-alvo.

Fonte: CÉSAR; CEZAR. Biologia 2. São Paulo, Ed Saraiva, 2002.

As glândulas adrenais são órgãos endócrinos pares, situados nos pólos superiores dos rins. Elas são formadas pelo parênquima glandular (córTEX e medula) e por tecidos de sustentação, estruturas vasculares e nervos formando o estroma. O córtex e a medula são duas regiões muito distintas na glândula adrenal. O córtex está subdividido em três partes: zona glomerular, responsável pela produção de mineralocorticóides, como a aldosterona; zona fasciculada, onde ocorre a produção de glicocorticóides; e zona reticular, que tem como seus principais produtos os hormônios sexuais. A medula adrenal, porção central da glândula é composta por células cromafins, as quais sintetizam e secretam catecolaminas,

especialmente adrenalina, além de outros neuormônios (IDELMAN, 2000; STEWART, 2003).

O eixo HPA e o sistema simpático adrenomedular são componentes fundamentais da reação de estresse (CHROUSOS, 1995). Em condições patológicas como o câncer, esta reação é mediada por citocinas inflamatórias que incluem o TNF- α , IL-1 e IL-6. Essas são capazes de estimular a produção hipotalâmica do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e então ativar o eixo HPA, resultando na secreção de glicocorticóides, que agem como hormônios anti-inflamatórios endógenos, além de influenciarem o metabolismo glicídico, lipídico e protéico (ZALOGA et al., 2001). Além disso o CRH estimula a secreção de norepinefrina pela medula adrenal através de receptores específicos, assim como as catecolaminas estimulam a secreção de CRH / ACTH e cortisol (CHROUSOS, 1992; SAPER et al., 1976).

1.2.1 Sistema Imune e a Resposta de Estresse

O timo é um órgão linfóide primário bilobado, situado no mediastino anterior, e cada lobo dá origem a múltiplos lóbulos. Cada lóbulo se divide em córtex e medula, sendo a primeira uma região rica em linfócitos T, e a segunda, mais clara, composta por células dendríticas, macrófagos originados da medula óssea e menor quantidade de linfócitos. É no timo que ocorre a maturação dos linfócitos, ou seja, os timócitos, que são linfócitos mais imaturos, começam a adquirir receptores para antígenos e marcadores de superfície, transformando-se em linfócitos T maduros (CD4 e CD8). A seleção tímica e a deleção de linfócitos incompetentes também é uma das funções associadas ao timo (CORY, 1995).

Um exemplo de órgão linfóide secundário é o baço que está localizado no quadrante superior esquerdo do abdômen. É constituído pela polpa branca, uma região rica em linfócitos (B e T) e polpa vermelha, onde pode se observar numerosos macrófagos, células dendríticas, linfócitos esparsos e plasmócitos. O baço é o sítio principal das respostas imunes aos antígenos provenientes do sangue, além de atuar como depurador de eritrócitos senis e substâncias estranhas da corrente sanguínea (MACLENNAN, 1994).

Em uma resposta de estresse crônico, como ocorre no câncer avançado, o sistema imune pode sofrer diversas modificações. Selye (1936) observou que ratos expostos a agentes estressores apresentavam adrenais de tamanho aumentado e o timo e linfonodos reduzidos de tamanho devido à sua ação imunossupressora. Além disso, Hench et al (1949) demonstraram que a cortisona produzida pelas glândulas adrenais era capaz de suprimir órgãos imunes. Esses mecanismos de supressão envolvem a inibição de diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α , moléculas-chave presente na resposta inflamatória como óxido nítrico e PAF (fator de ativação plaquetária), além da inibição do ácido aracdônico com conseqüente inibição da produção de prostaglandinas e leucotrienos (IMURA et al., 1991; REICHLIN, 1993; CHAPMAN; GOODELL, 1963).

O resultado dessas alterações é uma resposta imunológica totalmente comprometida devido ao bloqueio da quimiotaxia de leucócitos e células inflamatórias e bloqueio da resposta dessas células de defesa no combate ao agente agressor, além da supressão de órgãos imunes (CRONSTEIN et al., 1992; ZITNIK et al., 1994).

1.3 ASPECTOS MOLECULARES E FUNCIONAIS DO CÓRTEX ADRENAL

Conforme explicado anteriormente, o CRH e ADH produzidos no hipotálamo promovem a secreção de ACTH por células especializadas da adeno-hipófise. Após atingir a corrente sanguínea, o ACTH se liga a receptores específicos denominados MC2R (receptor para melanocortina tipo 2) (figura 3) que faz parte da família de receptores com 7 domínios trans-membrana acoplados à proteína G e estão localizados no córtex da glândula adrenal (IDELMAN, 2000; CLARK et al., 2003). O ACTH liga-se nesse receptor e a subunidade α da proteína Gs ativa a enzima adenilato ciclase (AC), que leva à produção de AMP cíclico (LEFKOWITZ et al., 1971). Outros mecanismos de ação do ACTH também envolvem o citoesqueleto e outros segundo-mensageiros, tais como o cálcio e a proteína quinase C. O segundo-mensageiro mais importante é o AMPc que promove o aumento do número de receptores para LDL, transporte do colesterol para as mitocôndrias, síntese de

novo do colesterol, fosforilação de proteínas via proteína quinase A (PKA), síntese de DNA, transcrição de RNAm e síntese protéica, ativação da cascata das enzimas da esteroidogênese, multiplicação celular *in vivo*, metabolismo dos fosfolipídios e lipoproteínas. Um dos efeitos da estimulação dos receptores MC2R é a conversão do colesterol em pregnenolona, catalisada pela enzima colesterol desmolase.

Algumas proteínas como StAR (proteína regulatória aguda esteroidogênica) e Tspo (proteína translocadora) funcionam também como cofatores da esteroidogênese e são responsáveis pelo transporte do colesterol para dentro das mitocôndrias (RAFF et al., 2003). A StAR é expressa na zona fasciculada e glomerular do córtex adrenal de ratos, estando envolvida na regulação dos níveis de cortisol e aldosterona no plasma e em situações de estresse agudo, onde sua expressão é estimulada pelo ACTH (PETERS et al., 1998; KHISTI et al., 2003; ARIYOSHI et al., 1998). A Tspo é uma proteína que limita a etapa da esteroidogênese e está envolvida no transporte do colesterol, como a StAR, e sua expressão parece estar mais envolvida com a estimulação crônica pelo ACTH (RAFF et al., 2003; LEE et al., 2004).

Além disso, algumas enzimas são fundamentais na progressão da cascata enzimática de síntese do cortisol. É o caso da enzima 3-β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo I (3βHSDI), que é uma desidrogenase/isomerase expressa na adrenal, responsável pela conversão da pregnenolona em progesterona no interior do retículo endoplasmático (ABBAZADE et al., 1995; ZHAO et al., 1991).

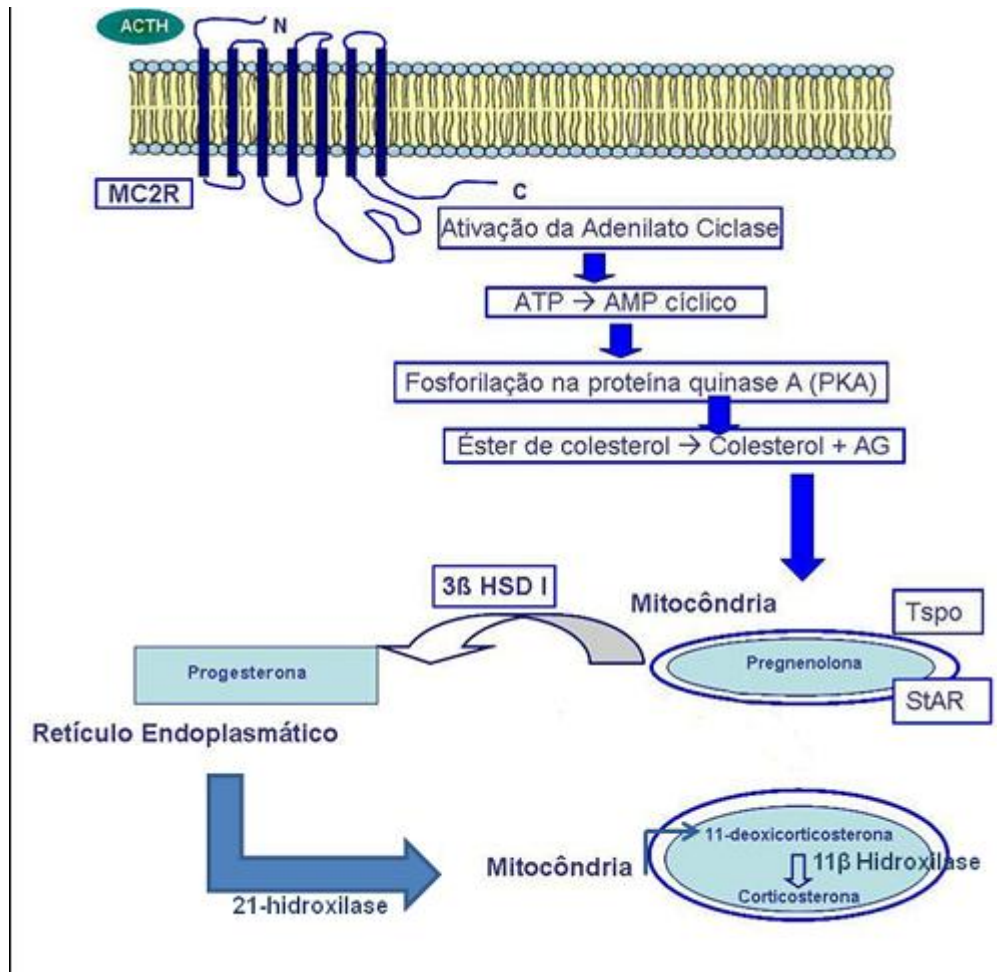


Figura 3 – Aspectos moleculares envolvidos na síntese da corticosterona.

1.4 GLICOCORTICÓIDES E SEUS EFEITOS

Os glicocorticóides naturais são sintetizados a partir do colesterol de acordo com as necessidades, sob a influência do ACTH. Além disso, a secreção de ACTH é regulada tanto pelo hormônio hipotalâmico CRH como pelo nível de glicocorticóides no sangue por *feedback* negativo (figura 1). Na espécie humana o cortisol é o principal glicocorticóide e possui ritmo circadiano, com um pico de manhã ao acordar (16 µg/dL) e um segundo pico (menor) no final da tarde (4 µg/dL), com seus níveis plasmáticos decrescendo ao longo do dia chegando a baixos níveis durante a noite e novamente aumentando progressivamente durante a madrugada até novamente atingir níveis máximos durante a manhã. Os ratos possuem hábitos noturnos, e por isso o ciclo é invertido e os níveis plasmáticos elevados de

corticosterona (principal glicocorticóide nos murinos) ocorrem no início da noite (BLISS et al., 1953; HERMAN et al., 1996).

Os glicocorticóides sintéticos são medicamentos análogos aos glicocorticóides naturais, utilizados com finalidade terapêutica. Exemplos desses medicamentos são a dexametasona, hidrocortisona, betametasona, beclometasona e prednisolona. Variam em potência farmacológica e meia-vida, além de diferentes afinidades pelos receptores para glicocorticóides e mineralocorticóides (IDELMAN et al., 2000).

A interação dos glicocorticóides com receptores intracelulares (GR) específicos de alta afinidade no citoplasma (GR α e GR β) pode promover a indução ou repressão da transcrição gênica através da migração do complexo esteróide-receptor para o núcleo e ligação a elementos do DNA. A repressão é obtida através da inibição de diversos fatores de transcrição, como NF-kB e AP-1 (TAK et al., 2001). A indução envolve a formação de mRNAs específicos, que dirigem a síntese de proteínas, como quinase dependente de AMPc (LAMBERTS et al., 1997). Um dos principais efeitos é a inibição da expressão de genes da fosfolipase A2, ciclooxigenase 2 e óxido nítrico sintase 2, diminuindo a produção de PAF, prostanoídes e óxido nítrico, substâncias-chave da resposta inflamatória (NAKANO et al., 1990; O'BANION et al., 1992; MONCADA et al., 1993).

Os glicocorticóides também influenciam no tráfego de leucócitos circulantes, através da inibição da expressão de moléculas de adesão e seus respectivos receptores, além de inibir muitas funções dessas células. Eles suprimem a ativação de leucócitos, especialmente linfócitos Th1, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-1 β e outros mediadores inflamatórios, além de causar resistência a essas substâncias. A apoptose de eosinófilos e alguns grupos de células T podem ser resultado da ação dos glicocorticóides (MONCADA et al., 1993).

Dentre as funções fisiológicas dos glicocorticóides (cortisolemia de até 400 nmol/dL) estão a manutenção da glicemia, pressão arterial, temperatura corporal e massa muscular, controle da ingestão de alimentos, ação imunomoduladora e neurotransmissora. As propriedades antiinflamatórias (acima de 1000 nmol/dL) e imunossupressoras (acima de 2000 nmol/dL) dos glicocorticóides promovem uma série de alterações metabólicas e imunológicas no organismo (figura 4) (BOUMPAS et al., 1993).

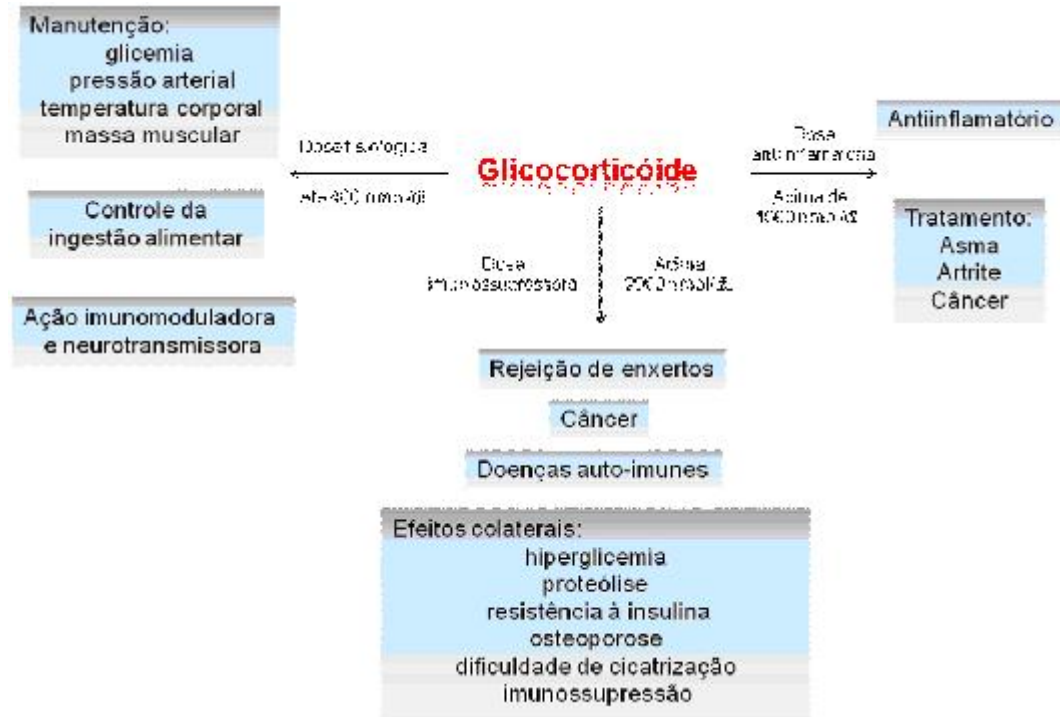


Figura 4 – Glicocorticóides e seus efeitos.

Seu uso é indicado como droga antiinflamatória, no tratamento de asma, algumas doenças auto-imunes, como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, além da ação imunossupressora contra rejeição de enxerto em pacientes transplantados (BARNES, 2006; BOUMPAS et al., 1993). Em pacientes com câncer, especialmente de próstata e mama, os glicocorticóides são utilizados na prevenção da progressão tumoral e melhora na taxa de sobrevivência, além de efeitos estimulantes sobre o apetite no curto prazo (OSBORNE et al., 1979; VAN HALTEREN et al., 2003).

Altas doses de glicocorticóides podem resultar em aumento da proteólise, hiperglicemia, aumento da resistência à insulina, osteoporose, dificuldade de cicatrização e diminuição da resposta imunológica (BOUMPAS et al., 1993). Além disso, a administração de doses elevadas de glicocorticóides pode causar atrofia muscular em humanos (DARDEVET et al., 1995; MITCH; GOLDBERG, 1996). Esse efeito é devido à ação inibitória da síntese protéica somada à ação estimulatória da degradação de proteínas em músculo esquelético causado pelos glicocorticóides (ROY et al., 1983; SAVARY et al., 1998; SEENE, 1994; FERRANDO et al., 1999). Outra explicação para a perda de massa muscular é a indução da expressão de

miostatina pelos glicocorticóides. A miostatina, que é conhecida como fator 8 de diferenciação e crescimento, é um membro da superfamília do fator transformante de crescimento- β e funciona como regulador negativo da massa muscular esquelética (MA et al., 2003). Assim, o uso crônico de glicocorticóides por pacientes com câncer avançado pode levar à caquexia.

1.5 O MEGESTROL NO TRATAMENTO DA ANOREXIA NO CÂNCER AVANÇADO

O megestrol é um hormônio pertencente à classe das progestinas sendo um análogo da progesterona utilizado como terapia hormonal de segunda linha para o câncer de mama metastático dependente de hormônio, bem como para o tratamento do carcinoma endometrial previamente tratado por cirurgia e radioterapia. Na hipófise, o megestrol possui propriedades agonistas progesteracionais, reduzindo a secreção de LH. Além disso, as progestinas estimulam o apetite e restauram a sensação de bem-estar em pacientes caquéticos com câncer e AIDS em estágios avançados (LOPRINZI et al., 1992; LUNDGREN et al., 1996; NAING et al., 1999). Seu mecanismo de ação não é muito bem conhecido, mas acredita-se que a estimulação do apetite possa ser explicada pela ação mediadora do megestrol na inibição da produção de citocinas, indução do apetite por ação hipotalâmica ou ambos (MANTOVANI et al., 1998; MCCARTHY et al., 1994).

Outra propriedade importante do megestrol é a sua ação antiandrogênica, agindo como agonista parcial fraco e inibidor competitivo do receptor de androgênio no tecido-alvo. Assim, é eficaz no tratamento de cânceres dependente desses receptores (Liu et al., 2002).

Além disso, o megestrol possui a propriedade de suprimir a secreção de ACTH e cortisol, provavelmente através de efeitos agonistas sobre os receptores GR (BOTELLA et al., 1986; DAVID et al., 1963). A ação sobre esses receptores também pode induzir o apetite em pacientes tratados com megestrol (MANN et al., 1997).

1.6 JUSTIFICATIVA

As taxas elevadas de morbidade e mortalidade causadas pelo câncer avançado justificam a necessidade de maiores estudos sobre a sua fisiopatologia. Está cada vez mais evidente que os mecanismos que envolvem a regulação biológica do organismo estão baseados em uma interação funcional e coordenada entre o sistema endócrino (células neurosecretoras hipotálamo-hipofisárias e seus órgãos-alvo), o sistema nervoso central e periférico e o sistema imune (POLAK; BLOOM, 1986; KVETNOY et al., 2000). O sistema neuroendócrino exerce influência em praticamente todos os órgãos e participa da produção de substâncias biologicamente ativas que possuem um papel fundamental na regulação da homeostase, agindo através de mecanismos por via neuroendócrina, endócrina e parácrina. Além disso, sabe-se que neurônios e células imunocompetentes possuem interações muito próximas e bem estabelecidas que regulam a homeostase sistêmica através da produção e secreção de uma variedade de mediadores celulares, como citocinas, hormônios peptídicos e quimiocinas (SALZET, 2002). Por outro lado, algumas citocinas, incluindo o TNF- α , são produzidas pelo câncer avançado, sendo determinantes no desenvolvimento da anorexia e da caquexia (GUTTRIDGE et al., 2000). Portanto, o sistema neuroimunoendócrino tem participação fundamental neste contexto e suas respostas merecem estudo para melhor compreensão da SAC relacionada ao câncer.

Pacientes portadores de câncer avançado e SAC são tratados empiricamente com esteróides cujos mecanismos de ação estão relacionados ao seu efeito glicocorticóide, com potencial efeito inibitório sobre o eixo HPA e demais efeitos colaterais já descritos, mas que dependem da dose utilizada. Em certos casos há relato de redução da anorexia, enquanto que em outros pode acontecer redução da progressão tumoral, porém tais efeitos ainda não foram totalmente compreendidos. Nesse contexto, esses fármacos podem agir inibindo ou favorecendo o desenvolvimento tumoral dependendo da dose utilizada, condição clínica e estágio de evolução da doença, bem como promover ação deletéria sobre o sistema neuroimunoendócrino nesses pacientes ou piorar a caquexia devido ao possível efeito farmacológico indesejado (BARNES, 2006). Entretanto, se considerarmos que a anorexia decorre de mediadores inflamatórios produzidos em

resposta à presença do tumor, a inibição do crescimento tumoral como resultado terapêutico com esteróides poderia ser benéfica sobre a anorexia e a caquexia.

Diante dos fatos mencionados, o estudo de órgãos envolvidos nesse complexo sistema neuroimunoendócrino se fundamenta na necessidade de compreensão do processo de caquexia neoplásica. Esses resultados, juntamente com a avaliação da resposta ao tratamento com esteróides utilizando um modelo animal de SAC, poderão proporcionar subsídios e informações relevantes para o estabelecimento de medidas visando reduzir as taxas de morbimortalidade causada pelo câncer avançado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Estabelecer o padrão de resposta morfológica e funcional do eixo hipófise-adrenal e do sistema imune no desenvolvimento do câncer avançado associado à caquexia.
- Analisar o efeito de medicamentos com ação esteróide utilizados na terapêutica clínica no quadro de caquexia neoplásica, através de um modelo experimental de caquexia em ratos induzida por tumor Walker-256.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito da dexametasona em doses antiinflamatória e imunossupressora, e do megestrol, sobre a anorexia, a perda de peso, a evolução tumoral e o sistema neuroimunoendócrino, em ratos caquéticos induzidos por tumor Walker-256.
- Padronizar uma técnica de coloração histológica específica para a glândula hipófise, a partir das técnicas originais de Tetracrômio de Herlant e AB-PAS-Orange-G, permitindo interpretar suas alterações histopatológicas nos animais estudados.
- Caracterizar a resposta adrenal de secreção de corticosterona nos ratos com caquexia neoplásica, comparativamente ao aspecto morfológico dos corticotrofos na hipófise.
- Analisar o perfil de expressão dos genes que codificam o receptor MC2R, proteínas StAR e Tspo (co-fatores para o transporte do colesterol) e 3 β HSDI (uma enzima-chave da esteroidogênese para produção de corticosterona) e comparar à resposta morfológica das glândulas adrenais de animais portadores de caquexia neoplásica sob diferentes tratamentos.
- Estudar as alterações histopatológicas do timo e do baço bem como a porcentagem leucocitária nesses animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos pesando entre (200-300 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno com cepilho, nas dimensões de 20 cm de largura por 35 cm de comprimento por 18 cm de profundidade. Os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada, sob ciclo de claro/escuro de 12 horas, sendo alimentados *ad libitum* com água e alimento completo durante o experimento com 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de gorduras (Nuvital Nutrientes, Curitiba-PR, Brasil).

Todos os grupos receberam pré-tratamento com dexametasona (dexametasona 0,5 mg/5 mL elixir - Genérico – EMS) em dose imunossupressora (1mg/Kg) na água de beber por 2 dias (24 horas antes e no dia da inoculação das células tumorais). Esse protocolo foi padronizado a fim de permitir a obtenção de animais com crescimento tumoral semelhante.

No momento da inoculação (dia 0), os animais do grupo tumor receberam injeção de células tumorais enquanto que os animais do grupo controle receberam injeção de PBS (16,5 mM, NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM pH 7,4) (figura 5). A partir do 5º dia até o dia do sacrifício (10º dia), os animais dos grupos controle e tumor receberam um dos seguintes tratamentos:

- Veículo: PBS via subcutânea, ou óleo de milho via gavagem.
- Dex-AI: dexametasona (dexametasona fosfato dissódico 4mg/mL injetável – Decadron® - Ache) em dose antiinflamatória (0,05 mg/Kg/dia) diluída em PBS via subcutânea.
- Dex-IS: dexametasona em dose imunossupressora (1mg/Kg/dia) diluída em PBS via subcutânea.
- Meg: megestrol (acetato de megestrol 160 mg comprimidos – Femigestrol® - Bergamo) na concentração de 100 mg/Kg/dia dividido em duas doses diárias (uma de manhã e uma à tarde) dissolvido em óleo de milho via gavagem.

Os animais sem tumor sob diferentes tratamentos (Dex-AI, Dex-IS ou Meg) foram estudados apenas quanto à perda de peso corporal e índice de caquexia.

Para a realização dos experimentos, foram utilizados de 3 a 10 animais por grupo e o presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética e está cadastrado sob o número 43/07 (CEEA/UEL).

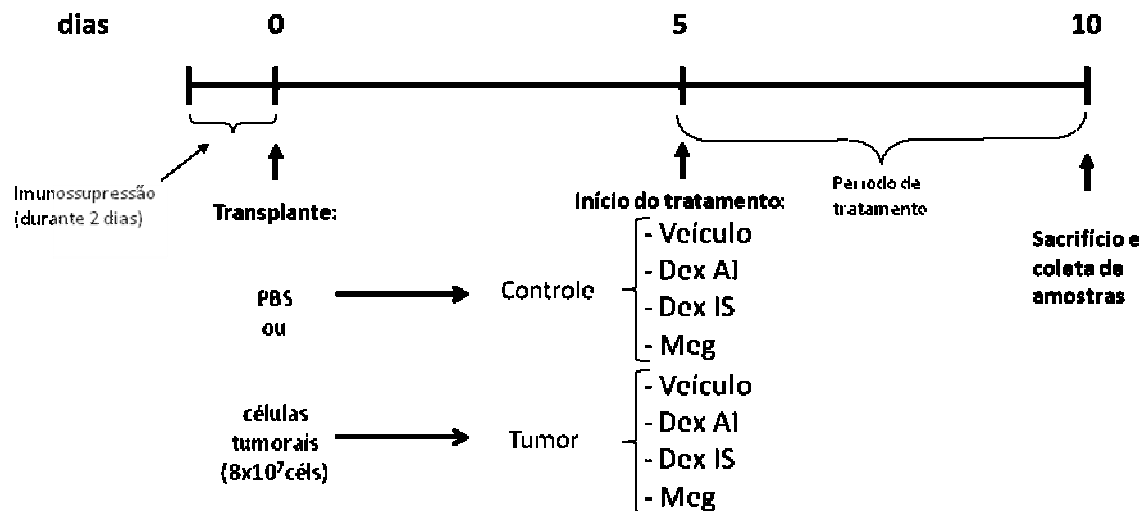


Figura 5 – Ordem cronológica dos experimentos. Grupo controle: Animais inoculados com PBS receberam veículo (PBS via subcutânea ou óleo de milho via gavagem), dexametasona em dose antiinflamatória (0,05 mg/Kg/dia via subcutânea – Dex-AI), dexametasona em dose imunossupressora (1 mg/Kg/dia via subcutânea – Dex-IS) ou megestrol (100 mg/Kg/dia dividido em 2 doses diárias via gavagem – Meg) a partir do 5º dia. Grupo tumor: Animais inoculados com células tumorais receberam veículo, Dex-AI, Dex-IS ou Meg a partir do 5º dia.

3.2 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DE WALKER-256

As células tumorais de Walker-256 foram mantidas em laboratório através de passagens semanais de células viáveis para a cavidade abdominal de ratos Wistar machos adultos. Os ratos com as células do tumor ascítico foram anestesiados com éter etílico e inoculados por via intraperitoneal com cerca de 6 mL de PBS gelado heparinizado para a remoção do líquido ascítico. Após centrifugação a 2500 rpm, durante 10 min e a 4°C, a fração composta por células tumorais foi removida e adicionada à igual volume de PBS. A viabilidade celular foi determinada

em câmara de Neubauer, através do método de exclusão pelo azul de Tripán. Cerca de 2×10^6 células/0,5 mL foram injetadas na cavidade abdominal de outro rato para a manutenção das células do tumor.

3.3 IMPLANTAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DE WALKER-256

Nos grupos experimentais com tumor foram inoculadas 8×10^7 células/0,5 mL na região posterior do flanco direito por via subcutânea com seringa e agulha de 0,45x13 26G. Nos grupos sem tumor foram injetados 0,5 mL de PBS na mesma região por via subcutânea. Os animais foram pesados antes do procedimento.

3.4 ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS

O peso dos animais e o consumo de ração foram mensurados diariamente. O volume do tumor foi medido no 4º, 6º, 8º e 10º dia após inoculação das células tumorais utilizando um paquímetro. Foi utilizada a seguinte fórmula: $V_t = C_t \times L_t \times (P_t - p_{fle}) \times 0,52333$ (COCHAND-PRIOLETT et al., 2003).

Onde:

V_t = volume do tumor (em cm^3)

C_t = comprimento do tumor

L_t = largura do tumor

P_t = profundidade do tumor

p_{fle} = profundidade do flanco esquerdo (sem tumor)

0,52333= fator para cálculo do volume de estruturas elipsóides

(3,14/6)

3.5 COLETA DE AMOSTRAS

Os animais foram anestesiados com solução de xilazina (xilazina 2,3% injetável - Anasedan® - Vetbrands) na concentração de 3 mg/Kg + ketamina (Ketamina Agener® 10% injetável - Agener União) na concentração de 90 mg/Kg via intraperitoneal. Após 5 minutos foi feito um corte com lâmina de bisturi na extremidade da cauda para a coleta de sangue em microtubo heparinizado destinado à dosagem da corticosterona basal. Após o teste de estímulo das glândulas adrenais foi realizada a punção intracardíaca para a coleta de sangue em microtubo heparinizado destinado à realização da dosagem da corticosterona sanguínea pós-estímulo com ACTH e dosagem do colesterol total. Além disso, uma pequena quantidade de sangue foi utilizada para a confecção de lâminas para a contagem hematológica diferencial de leucócitos. Os microtubos contendo plasma foram armazenados a -80°C.

3.6 TESTE DE ESTÍMULO DAS ADRENAIS COM ACTH

Com os animais anestesiados, foi administrado ACTH na concentração de 42 pm/Kg/100 µL via intraperitoneal para realização do teste de estímulo do córtex adrenal, sendo feita a coleta de sangue 15 minutos após a aplicação de ACTH.

3.7 SACRIFÍCIO E COLETA DE ÓRGÃOS

Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados por injeção intracardíaca de solução de KCl 10%. Foram dissecados e pesados o tumor, baço, timo, adrenal esquerda e hipófise e em seguida esses órgãos, foram colocados em solução fixadora de Bouin (75 mL de ácido pícrico concentrado + 25 mL de formol + 5 mL de ácido acético concentrado) para processamento histopatológico. A adrenal

direita dos animais foi retirada com lâmina de bisturi estéril e colocada em microtubos estéreis, contendo solução conservadora de nucleotídeos (TRIzol) para estudo molecular, os quais foram armazenados a -20°C.

3.8 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE CAQUEXIA

A porcentagem de perda de massa corpórea foi determinada utilizando-se a equação abaixo. Os animais foram considerados caquéticos quando apresentaram perda de massa corpórea maior ou igual a 10%.

$$\% \text{ Perda de massa corpórea} = \frac{[mie - mfe + (mt) + gmc]}{(mie + gmc)} \times 100$$

Onde:

mie = massa corpórea inicial do animal com tumor

mfe = massa corpórea final do animal com tumor

mt = massa do tumor

gmc = ganho de massa do grupo controle.

3.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA

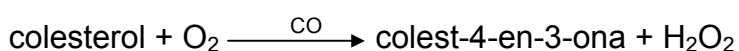
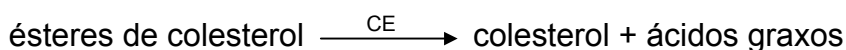
A concentração de corticosterona plasmática foi determinada por ensaio imunoenzimático (Corticosterone EIA Kit, Cayman Chemical), baseada na competição entre a corticosterona e um conjugado de corticosterona – acetilcolinesterase (AChE) por um número limitado de sítios ligadores em anticorpo de coelhos específico para corticosterona. Como a concentração de AChE é constante e a concentração do analito corticosterona a ser dosado varia, a quantidade de AChE que se liga no Ac de coelho é inversamente proporcional à concentração do analito corticosterona na solução estudada. O complexo Ac-corticosterona (analito ou AChE) se liga a um Ac monoclonal de camundongo anti-IgG de coelho que foi anteriormente aderido à placa. Em seguida, a placa é lavada

para remoção de possíveis interferentes e então o substrato para AChE é adicionado no poço. O produto da reação enzimática tem coloração amarela e com forte absorção na região de 412 nm. A intensidade dessa coloração, determinada espectrofotometricamente, é proporcional à quantidade de AChE ligada e inversamente proporcional à quantidade do analito corticosterona a ser dosado.

As amostras de plasma heparinizadas foram aplicadas em cada poço, nas diluições de 1:25 para corticosterona basal e de 1:100 para corticosterona pós-estímulo com ACTH. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro de placa 60 minutos após a adição do substrato.

3.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL

A concentração de colesterol total no plasma foi determinada por método enzimático, conforme descrito por Tietz (1995), onde os ésteres de colesterol são clivados a colesterol e ácidos graxos pela colesterol-esterase (CE). O colesterol resultante é oxidado enzimaticamente pela colesterol-oxidase (CO) a peróxido de hidrogênio e colest-4-en-3-ona. O peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase – POD (1000 U/L), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina - 4-AAP (0,5 mmol/L) e dá origem a um cromógeno com máximo de absorção no comprimento de onda de 505 nm. A leitura pode ser feita em espectrofotômetro após incubação de 10 minutos a 37 °C.



3.11 ESTUDO MOLECULAR DA GLÂNDULA ADRENAL

3.11.1 Pesquisa de Sequência Gênicas e *Primers*

Os genes estudados foram selecionados de modo que eles participassem da cascata da esteroidogênese, para se estabelecer o padrão de resposta funcional da glândula adrenal e o controle da mesma pelo hormônio adrenocorticotrófico. Portanto os genes selecionados foram: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), gene de controle interno, sendo ele constitutivo (está presente em todas as células); receptor para melancortina tipo 2 (MC2R); 3 β -desidrogenase I (3 β HSDI); proteína regulatória aguda esteroidogênica (StAR) e proteína translocadora (Tspo), que até recentemente era denominada de PBR (receptor benzodiazepínico periférico). As seqüências de RNA mensageiro (RNAm) e DNA genômico foram pesquisadas em bases de dados, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Ensembl (http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus), respectivamente. Foram localizados os éxons e íntrons de cada gene, para permitir a construção ou checagem de oligonucleotídeos (*primers*) capazes de amplificar o RNAm dos genes de interesse flanqueando pelo menos uma região intrônica, para diferenciação do fragmento transcrito e do fragmento genômico (à exceção do MC2R, gene de apenas 1 éxon).

Tabela 1 – Lista de *primers* utilizados para análise do receptor para ACTH, enzima e co-fatores da esteroidogênese. MC2R: receptor para melanocortina tipo 2; 3 β HSDI: 3 β -desidrogenase I; StAR: proteína regulatória aguda esteroidogênica; Tspo: proteína translocadora; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gene constitutivo de controle interno); pb: pares de base; T.A.: temperatura de anelamento; S: sense; AS: anti-sense.

| Genes | Nº de acesso NCBI | Produto de PCR (pb) | Seqüência do <i>primer</i> (5' – 3') | Nº de ciclos | T.A. | Referência |
|----------------|-------------------|---------------------|--|--------------|--------|--|
| MC2R | XM_001067549 | 150 | S- TGATCTTCTCCCACCATATCC AS- TCATGTTGGCTCTAGGAAGG | 35 | 53°C | Salzmann, C., <i>et al.</i> , 2004 |
| HSD3 β I | NM_001007719 | 264 | S- TCACATGTCCTACCCAGG AS- ATTTTTCAGGATGCTCCC | 35 | 51,8°C | Akingbemi, B. T., <i>et al.</i> , 2004 |
| StAR | NM_031558 | 389 | S- TTGGGCATACTCAACAACCA AS- ATGACACCGCTTTGCTCAG | 35 | 53,0°C | Akingbemi, B. T., <i>et al.</i> , 2004 |
| Tspo | NM_012515 | 198 | S- GCTATGGTTCCTTGGGTCT AS- CCAGGCCAGGTAAGGATACA | 30 | 53,5°C | EMBOSS versão 2.10.0 Win 0.8 |
| GAPDH | NM_01700 | 493 | S- ATGGTGAAGGTCGGTGTGAACG AS- GTTGTCATGGATGACCTTGCC | 30 | 55°C | Okamoto, T., <i>et al.</i> , 1996 |

3.11.2 Extração de RNA

Após descongelamento, as adrenais direitas foram fragmentadas utilizando-se um bastão de vidro devidamente autoclavado. Em seguida, foram agitadas em vortex por 30 a 60 segundos, seguida de 5 minutos de repouso em temperatura ambiente, e centrifugadas em spin a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi adicionado 200 μ L de clorofórmio gelado em cada microtubo, agitado no vortex por 15 segundos e centrifugado em spin 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, a fase superior aquosa contendo RNA foi retirada e adicionada em microtubo contendo 500 μ L de isopropanol gelado para precipitação do RNA. Depois disso, as amostras foram agitadas, incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas em spin 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Finalizada a centrifugação, o pellet foi lavado com 1 mL de etanol a 75% gelado, agitado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C seguido de secagem em temperatura ambiente. Por fim, o RNA obtido foi ressuscendido em água ultrapura livre de RNases e as amostras foram armazenadas a -80°C.

3.11.3 RT-PCR Semi – Quantitativa

A reação de RT (transcrição reversa) para obtenção do DNAc (DNA complementar) foi realizada segundo protocolo da enzima MMLV-RT (Invitrogen), seguida da quantificação por densitometria óptica através da relação A260/A280. Foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) com o DNAc obtido, usando os *primers* específicos para cada gene com uma temperatura de desnaturação a 94° C por 45 segundos, temperatura de anelamento específica de cada *primer* (tabela 1) por 45 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto e 30 segundos. Os fragmentos amplificados foram depositados em gel de acrilamida 10% em corrida paralela com um marcador de peso molecular padrão (ladder). Em seguida, os géis foram corados, revelados e fotodocumentados para quantificação computadorizada da densitometria das bandas contendo os produtos de PCR de peso esperado. A densitometria foi calculada utilizando-se o programa ImageJ 1,40g (NIH).

3.12 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

A inclusão do baço, timo, adrenal e hipófise foi realizada em estufa através de desidratação progressiva em álcool 70%, 80%, 95% e em seguida foram dados 3 banhos de álcool absoluto. Depois disso, 3 a 4 banhos de xilol (diafanização), seguidos de 4 banhos de parafina para impregnação seguida de inclusão. Os cortes para as colorações foram feitos em micrótomo com extensão sobre lâmina de vidro e apresentavam 5 µm de espessura para baço e timo, enquanto que adrenal e hipófise apresentavam 3 µm de espessura.

3.13 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS

Após a retirada da parafina com xilol e hidratação dos cortes (álcool absoluto, 95%, 80%, 70% e água destilada), as lâminas do baço, timo, adrenal e

hipófise foram coradas pelo método tradicional de hematoxilina-eosina (H&E) para análise estrutural e verificação da presença de metástases. As colorações especiais foram utilizadas somente para a hipófise, como descritos a seguir. Após a realização de cada coloração, as lâminas foram submetidas às etapas de desidratação, diafanização (xilol), montagem com xilol e lamínula sobre os cortes utilizando-se bálsamo do Canadá ou Entellan.

3.13.1 Colorações Especiais Para a Hipófise

Além da coloração de H&E (figura 6) para análise estrutural, foram utilizadas duas colorações em tetracrômio para, em associação, permitir a interpretação dos 5 subtipos celulares da adeno-hipófise.

Esses protocolos foram elaborados após uma compilação dos autores Herlant (1960), Kraicer (1967), Bencosme (1973), Baker (1977), Benjamin (1982), Mourlan (1994) e Trouillas (2003) com algumas modificações.

Coloração Tetracrômio de Herlant (TH): Após desparafinização e hidratação dos cortes, as lâminas foram coradas por 15 minutos com eritrosina 1%. Após lavagem rápida em água destilada os cortes foram corados com Mallory II por 10 minutos. Em seguida, foram lavados com água destilada e corados com azul de alizarina por 20 minutos. Novamente, os cortes foram lavados em água destilada e depois foi adicionado ácido fosfomolibdico 1% em solução aquosa por 15 minutos. A diferenciação citoplasmática foi feita utilizando ácido fosfomolibdico 1% em álcool 70% que permite diferenciar as células somatotrópicas (GH) com citoplasma alaranjado das células produtoras de prolactina com citoplasma vermelho, sempre acompanhando ao microscópio. Após a diferenciação, foi feita a passagem rápida em ácido fosfomolibdico 1% em álcool 90%, seguida de álcool absoluto e xilol para diafanização e montagem.

Ao fim da coloração, as células somatotróficas se apresentam de cor laranja, as produtoras de prolactina aparecem com grânulos vermelhos, as células gonadotróficas (FSH e LH) em azul claro e as células produtoras de ACTH em azul turquesa (tabela 2).

Tabela 2 – Interpretação dos tipos celulares da adeno-hipófise através das colorações de Tetracrômio de Herlant, Alcian-Blue-PAS-Orange G e Hematoxilina & Eosina. GH: hormônio do crescimento; PRL: prolactina; TSH: hormônio tireoestimulante; ACTH: hormônio adenocorticotrófico; FSH: hormônio folículo-estimulante; LH: hormônio luteinizante.

| Tipo de Coloração | Células Hipofisárias / Tipo de secreção hormonal | | | | |
|---|--|-----------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| | Somatotrofo GH | Lactotrofo PRL | Tireotrofo TSH | Corticotrofo ACTH | Gonadotrofo FSH/LH |
| Tetracrômio de Herlant (Lyon - J. Trouillas) | | | | | |
| AB-PAS-Orange G (1994 Mourlan) | | | | | |
| Hematoxilina & Eosina | Acidófila | Acidófila | Basófila | Basófila | Basófila |
| Topografia | Lateral | Lateral | Ventro-medial | Ântero-medial | Lateral |
| Abundância (%) | 50% | 20% | 2 - 5% | 15 - 20% | 5% |
| Tipo Celular | α | γ | δ | - | β / ν |
| Formato da Célula | Arredondada | Pequenas com grânulos | Poligonal | Arredondada | Grande e arredondada |

Para a realização da coloração por Tetracrômio de Herlant foram utilizados os seguintes corantes/reagentes e algumas técnicas importantes de preparação: a) Eritrosina (RAL 239 ou Erythrosine B Anachemia) 1% em tampão acetato de sódio pH 6.21; b) Mallory II : Azul de anilina hidrossolúvel (Chroma ou Gurr) 0,5% e Orange G (Anachemia, Chroma ou Gurr) 2% em água destilada pH<4. Foi dissolvido no calor e, após resfriado, foi acrescentado 8 mL de ácido acético; c) Azul de alizarina: azul de alizarina (acide alizarine blue BB michrome nº 9 E. Gurr) 0,5% e sulfato de alumínio 10% em água destilada. As substâncias foram fervidas com um pouco de água destilada durante cerca de 3 minutos até obter uma coloração azul-violeta. Após resfriado o volume foi completado para 100 mL (é necessário formar uma superfície marrom-metálica ou laca de alumínio) e filtrado após 24 horas; e d) Ácido fosfomolibdico 1% em álcool 70% e Ácido fosfomolibdico 1% em álcool 90%.

Coloração de Alcian blue – Ácido periódico de Schiff – Orange G (AB-PAS-OG): Os cortes hidratados foram oxidados pela mistura de Gomori por 10 minutos e em seguida foram descorados pela solução de metabissulfito de potássio 2%. Depois disso, foram corados pela solução de Alcian Blue 2% por 20 minutos e

lavados em água destilada para retirar o excesso de corante. Foi feita a oxidação dos cortes pela solução de ácido periódico 1% por 15 minutos e tratados com reagente de Schiff ao abrigo da luz por 20 minutos. Após essa etapa, é necessário que seja feita a viragem em água corrente por cerca de 10 minutos. Por fim, os núcleos foram corados com hematoxilina de Groat por 90 segundos, em seguida foi lavado com água destilada e as partes acidófilas foram coradas com orange G-fosfomolibdico por 10 minutos. As lâminas foram desidratadas em álcool 95% e álcool absoluto, seguida de xilol para diafanização e montagem.

Foram utilizados os seguintes corantes/reagentes e algumas técnicas importantes de preparação para a realização da coloração de Ab-PAS-OG: a) Mistura de Gomori: Solução de permanganato de potássio 2%, ácido sulfúrico 5% e água destilada na proporção de 1:1:6 volumes; b) Alcian Blue 2% pH 2.5: Alcian blue 2% em água destilada com 3% de ácido acético; c) Reagente de Schiff: Foi dissolvido 1 g de fucsina básica em um becker com 200 mL de água fervente, em seguida a mistura foi resfriada até 70°C, adicionado 2 g de metabissulfito de sódio ou bissulfito de sódio, agitado, resfriado novamente e adicionado 10 mL de ácido clorídrico 9%. Em seguida a solução foi tampada e conservada ao abrigo da luz por 24 horas, quando então podia ser filtrada com carvão ativado (essa solução deverá sair incolor); d) Hematoxilina de Groat: Foi preparado um becker (1) com água destilada contendo 2% de ácido sulfúrico e 2% de sulfato de amônio férrico. Além disso, foi utilizado outro becker (2) com etanol 95% contendo 1% de hematoxilina. Por fim, o Becker 1 foi vertido no Becker 2 e homogeneizado bem.

3.13.2 Interpretação dos Cortes Histopatológicos

Para a análise dos diferentes tipos celulares da adeno-hipófise foram feitas três lâminas histológicas da hipófise de cada animal para serem realizadas as colorações AB-PAS-Orange G, Tetracrômio de Herlant e Hematoxilina & Eosina.

As lâminas foram analisadas aos pares pelas colorações de AB-PAS-Orange G e Tetracrômio de Herlant, para a diferenciação dos cinco tipos celulares presentes na adenohipófise, de acordo com as cores da tabela 2. Os tipos celulares pesquisados foram: células somatotróficas (produtoras de GH), células

lactotróficas (produtoras de prolactina), células tireotróficas (produtoras de TSH), células corticotróficas (produtoras de ACTH) e células gonadotróficas (produtoras de FSH/LH). As lâminas coradas em H&E foram utilizadas para a análise morfológica geral da estrutura da hipófise.

Para a diferenciação das células produtoras de GH foi observada a existência de células com o citoplasma corado em laranja na coloração de TH (figura 8). Na observação de células produtoras de prolactina também foi utilizada a mesma coloração, observando-se a existência de células com grânulos corados em vermelho. Para a identificação de células produtoras de TSH foram analisadas as duas colorações simultaneamente. Utilizando a coloração de AB-PAS-OG foi verificada a presença de células coradas em azul escuro, e em seguida foi observada a existência de células com cor azul escura e formato poligonal pela coloração de TH, na mesma região em que foram observadas na primeira coloração, para que fosse confirmada a presença dos tireotrofos. Também foi necessário a análise das 2 lâminas em conjunto para a identificação das células produtoras de ACTH. Após verificada a existência de células coradas em rosa forte com formato arredondado pela coloração de AB-PAS-OG (figura 7), foi confirmada a presença nos mesmos locais de células coradas em azul escuro com o mesmo formato redondo pela coloração de TH, mostrando assim a presença de corticotrofos naquelas regiões hipofisárias. Por fim, na identificação das células gonadotróficas foram analisadas primeiramente as lâminas coradas pelo TH, à procura de células com citoplasma grande corado em azul claro e com grânulos muito finos claros (aspecto arenoso). Depois disso, foi confirmada pela coloração de AB-PAS-OG a presença de células grandes, redondas e coradas em azul escuro no mesmo local em que foram encontradas as células de coloração azul-claras identificadas pela coloração de TH (essas células são diferentes dos tireotrofos, que também se coram em azul escuro pela coloração de AB-PAS-OG). Foi realizada uma análise da quantidade de cada tipo celular específico da adeno-hipófise (somatotrofos, tireotrofos, corticotrofos, lactotrofos e gonadotrofos) através de *score*. Em seguida os *scores* foram transformados em porcentagem para posterior análise estatística. Os critérios de quantificação dos diferentes tipos celulares da adeno-hipófise estão apresentados na tabela 3.

Na análise histopatológica do baço, a análise morfológica e estrutural foi avaliada por *score* e a presença/ausência de imunossupressão e

metástases foi dada em porcentagem de animais por grupo. Para a análise morfológica foram utilizados os critérios de acordo com a tabela 4.

Tabela 3 – Interpretação da quantidade de células específicas (score) da adeno-hipófise.

| Score | Quantidade de células |
|--------------|------------------------------|
| 0 | ausência da célula |
| +1 | raras |
| +2 | quantidade média |
| +3 | muitas células |
| +4 | em toda a glândula |

Tabela 4 – Interpretação das alterações estruturais (score) na análise morfológica do baço. O sinal negativo indica características de imunossupressão.

| Score | Características estruturais |
|--------------|--|
| 0 | polpas coalescentes e grandes (controle – veículo) |
| -1 | polpas pequenas e numerosas |
| -2 | polpas pequenas e esparsas |
| -3 | polpas praticamente não identificáveis |
| -4 | alteração da arquitetura (centro diferente da periferia) |

Hematoxilina e Eosina

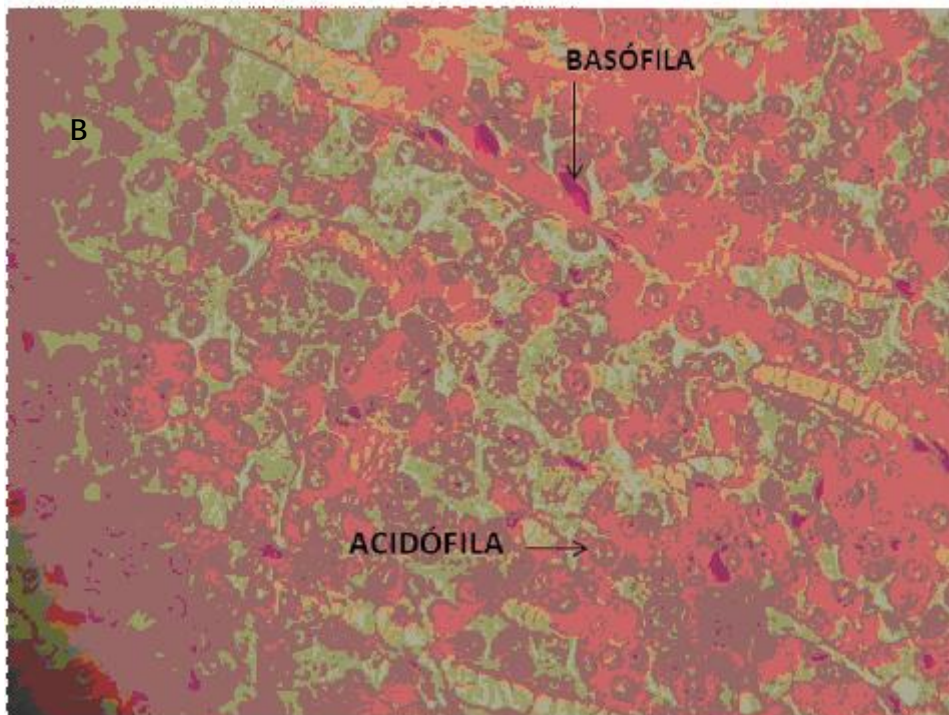
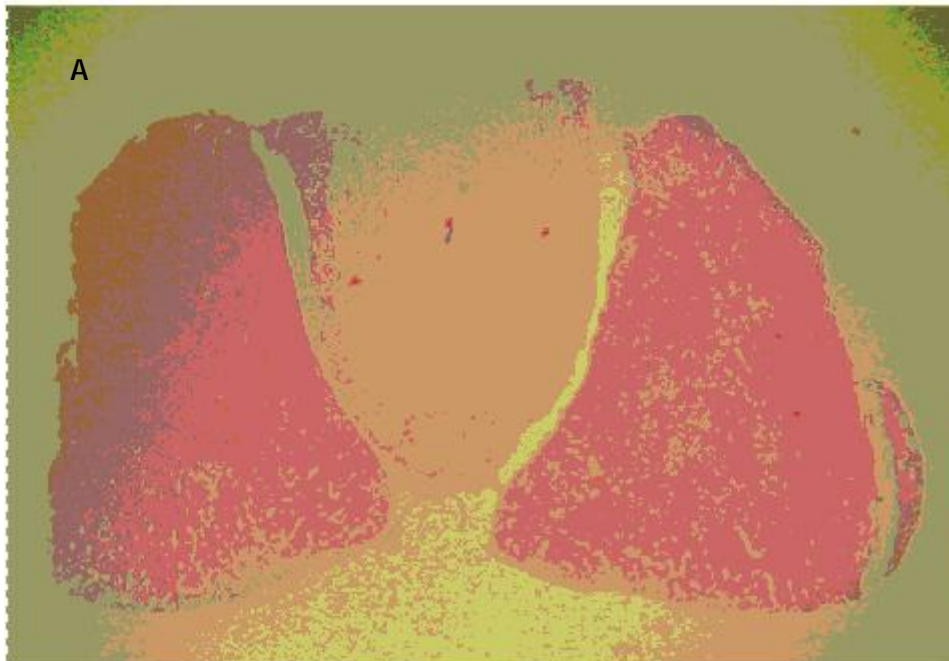


Figura 6 – Coloração de Hematoxilina&Eosina: A – panorâmico (4x); B – células basófilas e acidófilas (40x).

AB-PAS-Orange G

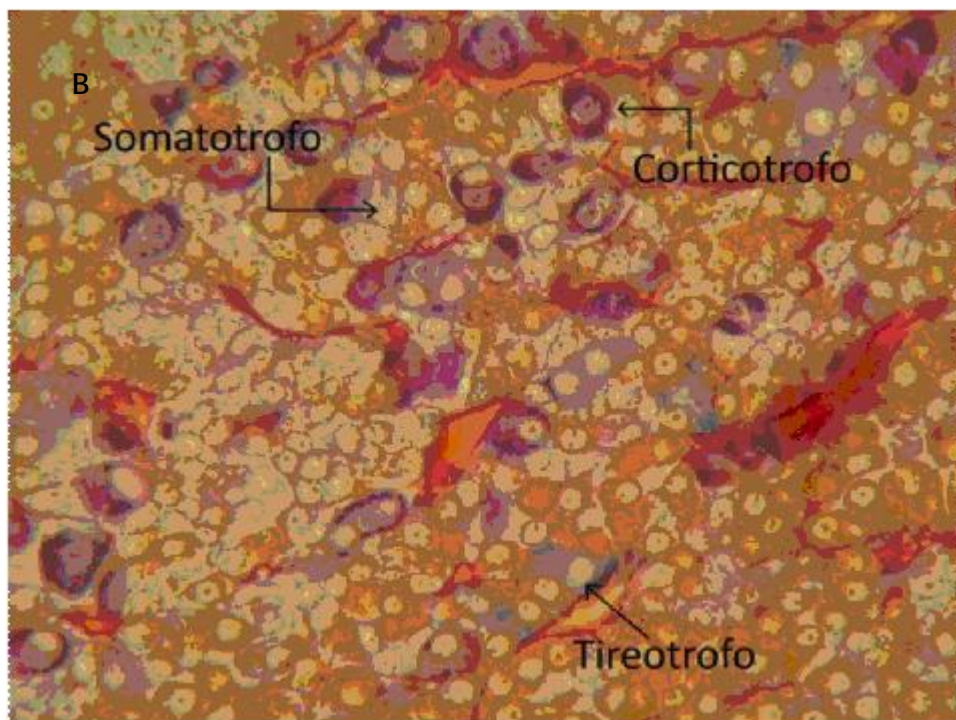
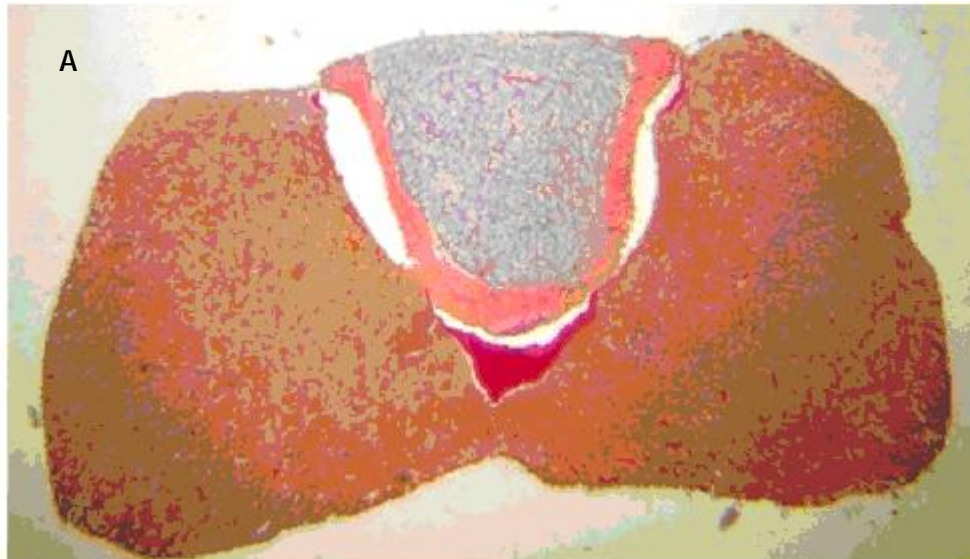


Figura 7 – Coloração de Alcian blue-PAS-Orange G: A – fotografia panorâmica da glândula hipófise (4x); B – células corticotróficas (rosa forte e redondas), somatotróficas e tireotróficas (azul) (40x com zoom de 3x).

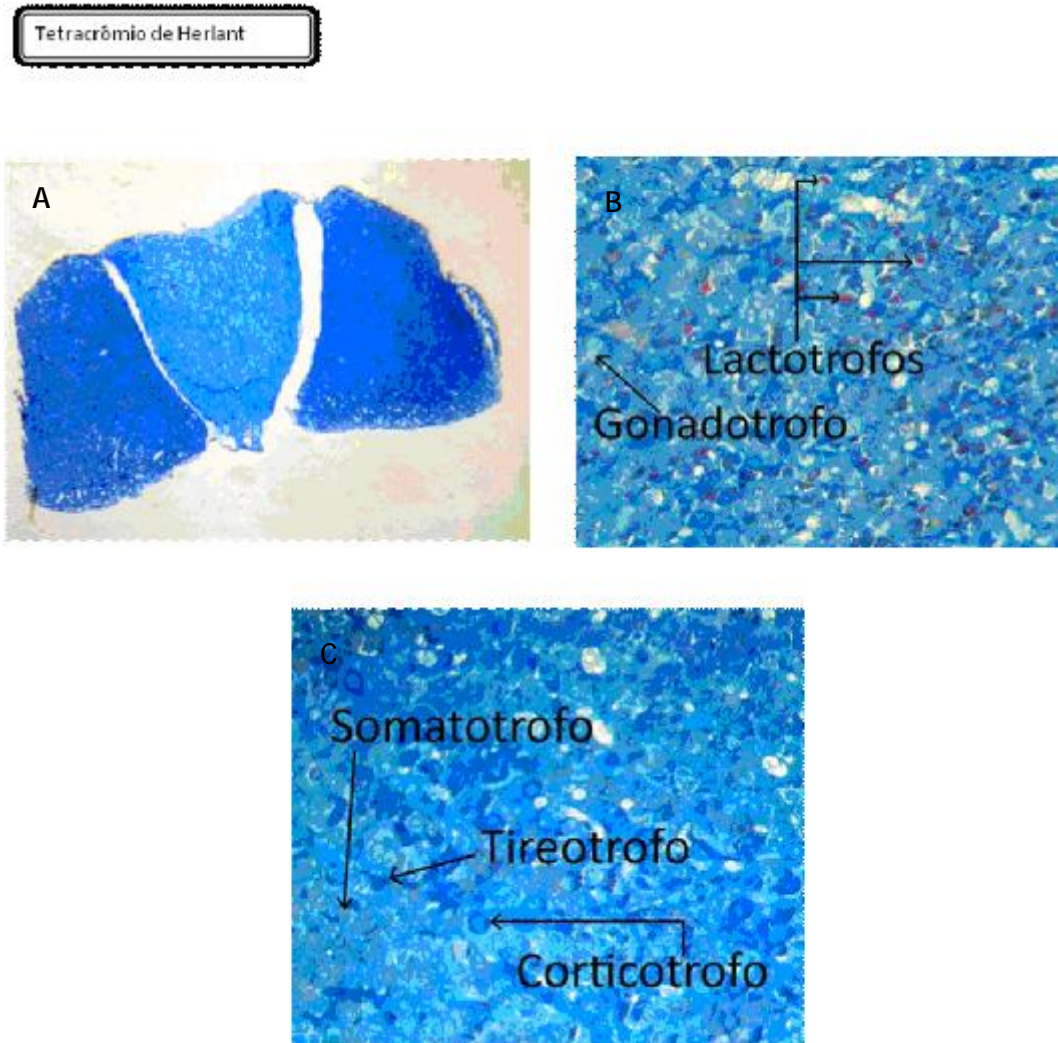


Figura 8 – Coloração de Tetracrômio de Herlant: A – panorâmico (4x); B – células lactotróficas (vermelhas) e gonadotróficas (citoplasma grande e azul-claro de aspecto arenoso) (40x); C – células somatotróficas (laranja), tireotróficas (azul-escuro e poligonal) e corticotróficas (azul-escuro e redondas).

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média de 3 a 10 animais por grupo. Para análise dos dados, foram utilizados o teste *t* tipo de *Student* para comparação de 2 grupos, one-way ANOVA seguida do pós-teste Newman-Keuls para comparação de 3 ou mais grupos, two-way ANOVA seguida de Newman-Keuls ou Bonferroni para comparação de vários parâmetros entre os grupos e teste de TUKEY para análise histopatológica do baço. Foi utilizado o

programa GraphPad Prism V.4.0. para a realização dos testes estatísticos e confecção dos gráficos. A medida das áreas do córtex e medula adrenais foi realizada utilizando-se o programa Image Pro Plus 5.0.1. e a densitometria das bandas eletroforéticas foi calculada utilizando-se o programa ImageJ 1,40g (NIH). Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS AOS GRUPOS CONTROLE E TUMOR (TRATADOS COM VEÍCULO)

4.1.1 Caracterização da Síndrome de Anorexia-Caquexia

A figura 9 mostra a variação diária do peso corporal, em porcentagem, dos grupos controle e tumor. Como pode ser observado, houve diminuição significativa do peso corporal do grupo tumor a partir do 6º dia até o 10º dia. No 9º e 10º dias a diferença entre os grupos atingiu valores de aproximadamente 11%. Em termos de valores absolutos, a média do peso (10º dia) dos animais portadores de tumor foi de $227 \pm 17g$ enquanto que o grupo controle apresentou valores de $262 \pm 24g$.

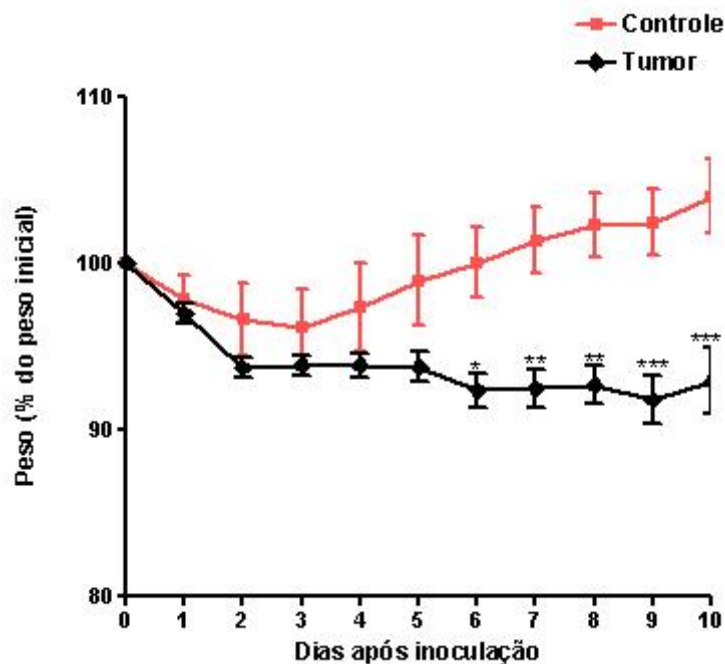


Figura 9 – Evolução do peso corporal diário (% do peso inicial) de ratos controle e portadores de tumor Walker-256 a partir do dia 0 até o 10º dia após inoculação das células tumorais. Resultados analisados por ANOVA two-way seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle. $n=7$.

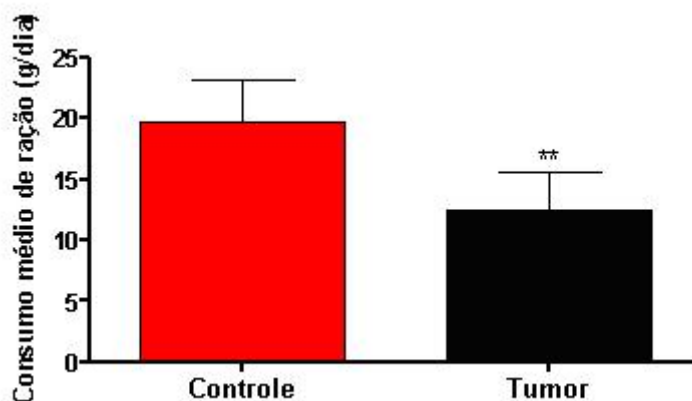


Figura 10 – Consumo médio de ração de ratos controle e portadores de tumor. Foi calculada a média de consumo dos últimos 5 dias, a partir do início da perda ponderal do grupo tumor. Resultados analisados por teste *t Student*. ** $p < 0,01$ versus controle. $n=7$.

Houve uma redução significativa no consumo de ração dos ratos portadores de tumor Walker-256 nos últimos 5 dias de aproximadamente 37%, comparados ao grupo controle (figura 10).

4.1.2 Sistema Imunológico e Caquexia Neoplásica

A figura 11 mostra um aumento de 121% no peso relativo do baço de animais com tumor Walker-256 em relação ao grupo controle. Em relação ao peso absoluto do baço, os grupos tumor e controle apresentaram valores de $1,36 \pm 0,36$ g e 756 ± 134 mg, respectivamente. Não houve diferença significativa no peso relativo do timo entre os 2 grupos, sendo os valores absolutos de 156 ± 77 mg para o tumor e 190 ± 91 mg para o controle. Foi possível observar alteração estrutural do baço e timo de ratos portadores de tumor Walker-256 em relação ao grupo controle, além da presença de metástase naqueles animais (figuras 13, 14 e 17).

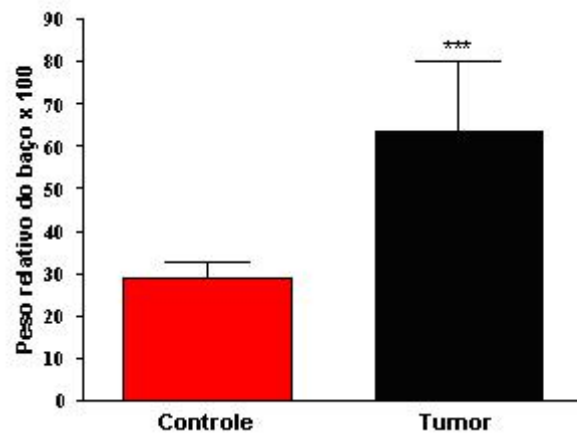


Figura 11 – Peso do baço relativo ao peso corporal do animal no momento do sacrifício, em ratos controle e portadores de tumor (subtraindo-se o peso do tumor do peso corporal total). Resultados analisados por teste *t Student*. *** $p < 0,001$ versus controle. $n=7$.

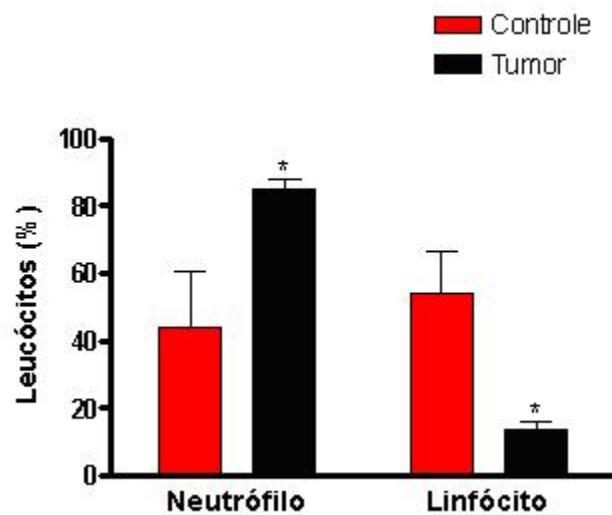
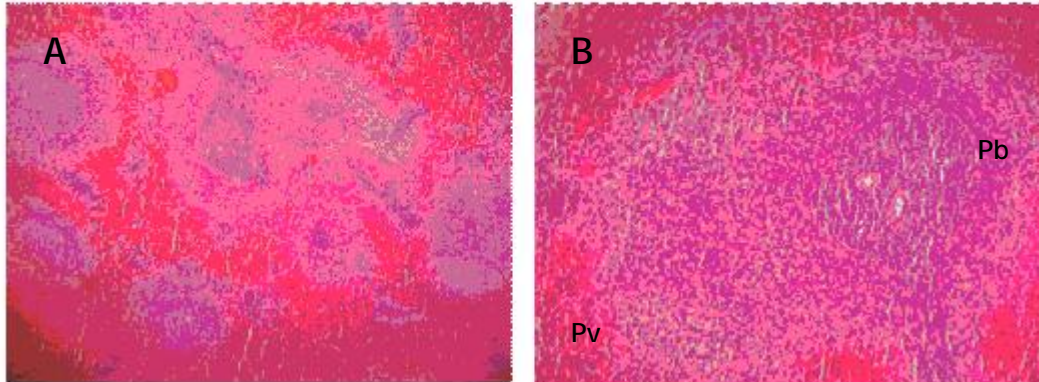


Figura 12 – Quantidade relativa de neutrófilos e linfócitos em ratos controle e portadores de tumor. Coloração utilizada: Rosenfeld. Resultados analisados por teste *t Student*. * $p < 0,05$ versus controle. $n=5$.



CONTROLE



TUMOR

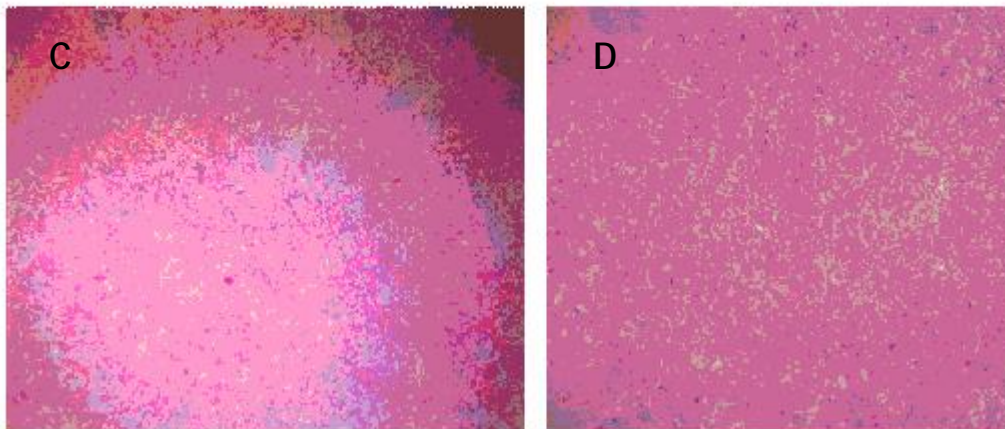
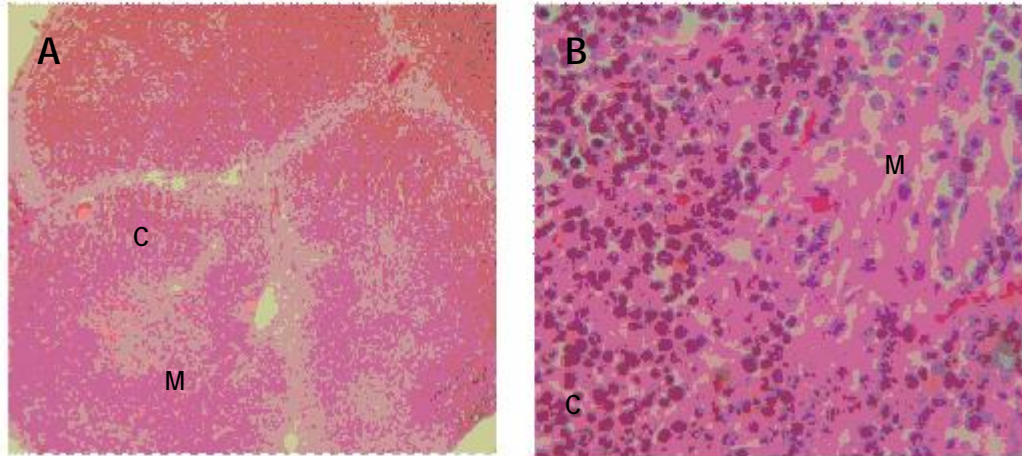


Figura 13 – Cortes histopatológicos do baço de animais do grupo controle (A e B) e tumor (C e D) corados com Hematoxilina & Eosina. A: Fotomicrografia mostra arquitetura do baço preservada (aumento de 4x com zoom de 3x). B: Em objetiva de 10x e zoom de 3x observa-se a polpa branca (Pb) e polpa vermelha (Pv) íntegras. C: Fotografia mostra um animal com tumor apresentando arquitetura do baço destruída (aumento 4x) D: No aumento de 4x e zoom de 3x observa-se alteração estrutural e destruição das polpas.



CONTROLE



TUMOR

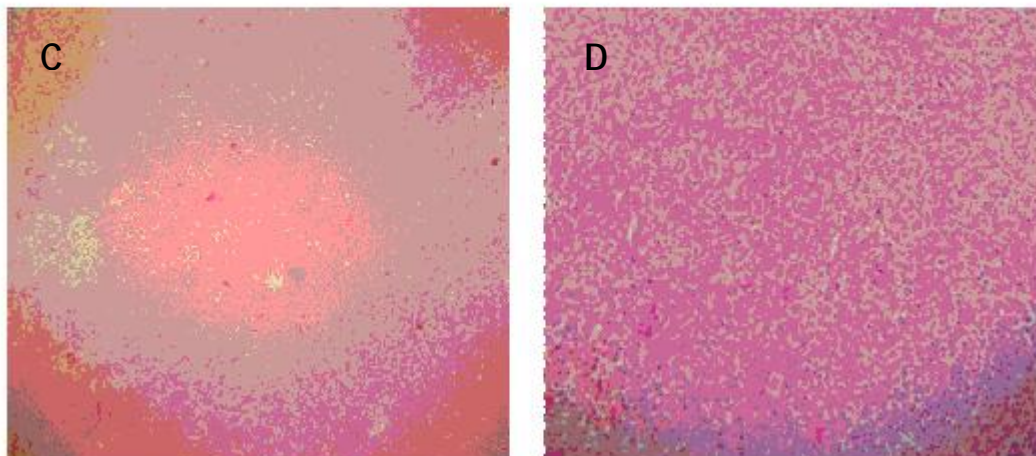


Figura 14 – Cortes histopatológicos do timo de animais do grupo controle (A e B) e tumor (C e D) corados com Hematoxilina & Eosina. A: Fotomicrografia mostra arquitetura do timo preservada (objetiva de 10x). É possível observar as regiões de córtex (C) e medula (M) de cada lóbulo. B: Em objetiva de 40x observa-se o córtex e a medula íntegros. C: Fotografia mostra um animal com tumor apresentando arquitetura do timo destruída (aumento 4x e zoom de 1.5x). Pode-se observar a perda dos lóbulos, formando uma massa única e ausência de córtex e medula. D: No aumento de 10x e zoom 3x observa-se alteração estrutural e destruição dos lóbulos.

Em relação à análise quantitativa de leucócitos, observou-se na figura 12 um aumento de 93% na quantidade relativa de neutrófilos do grupo tumor

em relação ao grupo controle. Porém, a porcentagem de linfócitos naquele grupo foi reduzida em 75%.

4.1.3 Resposta Morfológica e Funcional do Eixo HPA

Na análise do tamanho da glândula adrenal, observou-se aumento de 521% no peso relativo da adrenal de animais portadores de tumor Walker-256 em relação ao grupo controle (figura 15 e 16). A relação córtex/medula não foi estatisticamente diferente entre esses 2 grupos analisados exibindo valores de $5,6 \pm 1,9$ unidades arbitrárias (ua) para o controle e $6,2 \pm 1,3$ ua para o tumor.

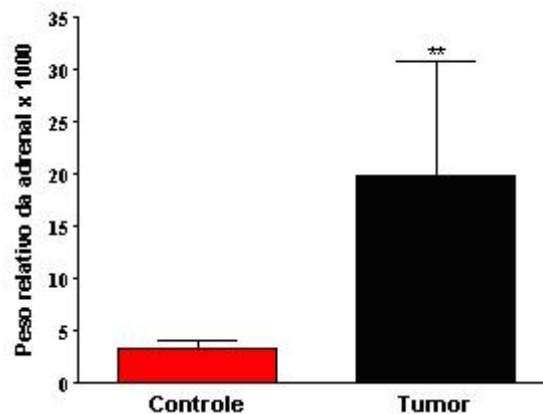
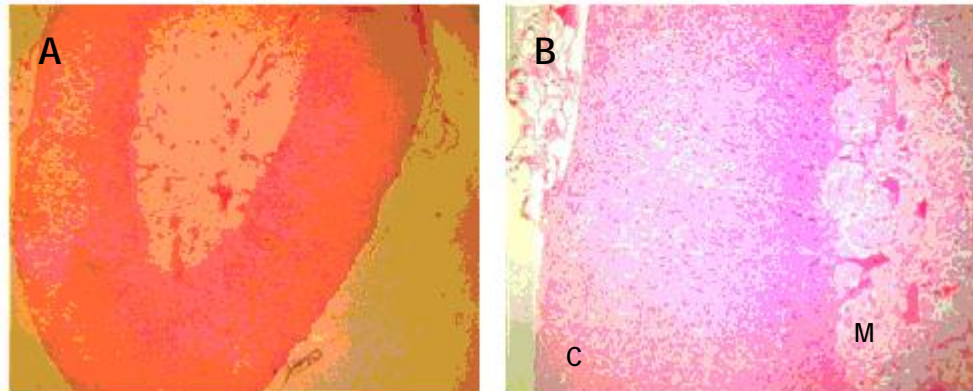


Figura 15 – Peso da adrenal relativo ao peso corporal do animal no momento do sacrifício, em ratos controle e portadores de tumor (subtraindo-se o peso do tumor do peso corporal total). Resultados analisados por teste *t Student*. ** $p < 0,01$ versus controle. $n = 7$.

Adrenal

CONTROLE



TUMOR

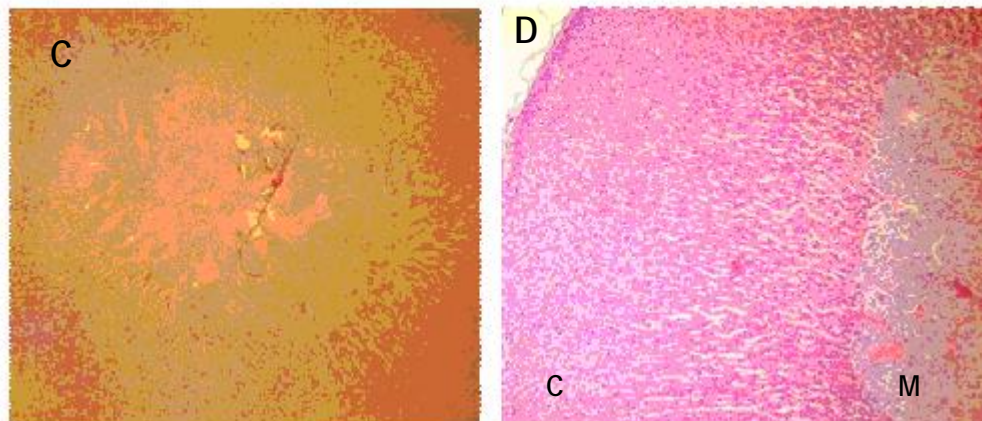


Figura 16 – Cortes histopatológicos da adrenal de animais do grupo controle (A e B) e tumor (C e D) corados com Hematoxilina & Eosina. A: Fotomicrografia mostra a glândula adrenal preservada (objetiva de 4x). B: Em objetiva de 10x observa-se o córtex (C) e a medula (M) íntegros. C: Fotografia mostra um animal com tumor apresentando aumento da glândula adrenal (objetiva de 4x). D: No aumento de 10x é possível observar aumento da região cortical.

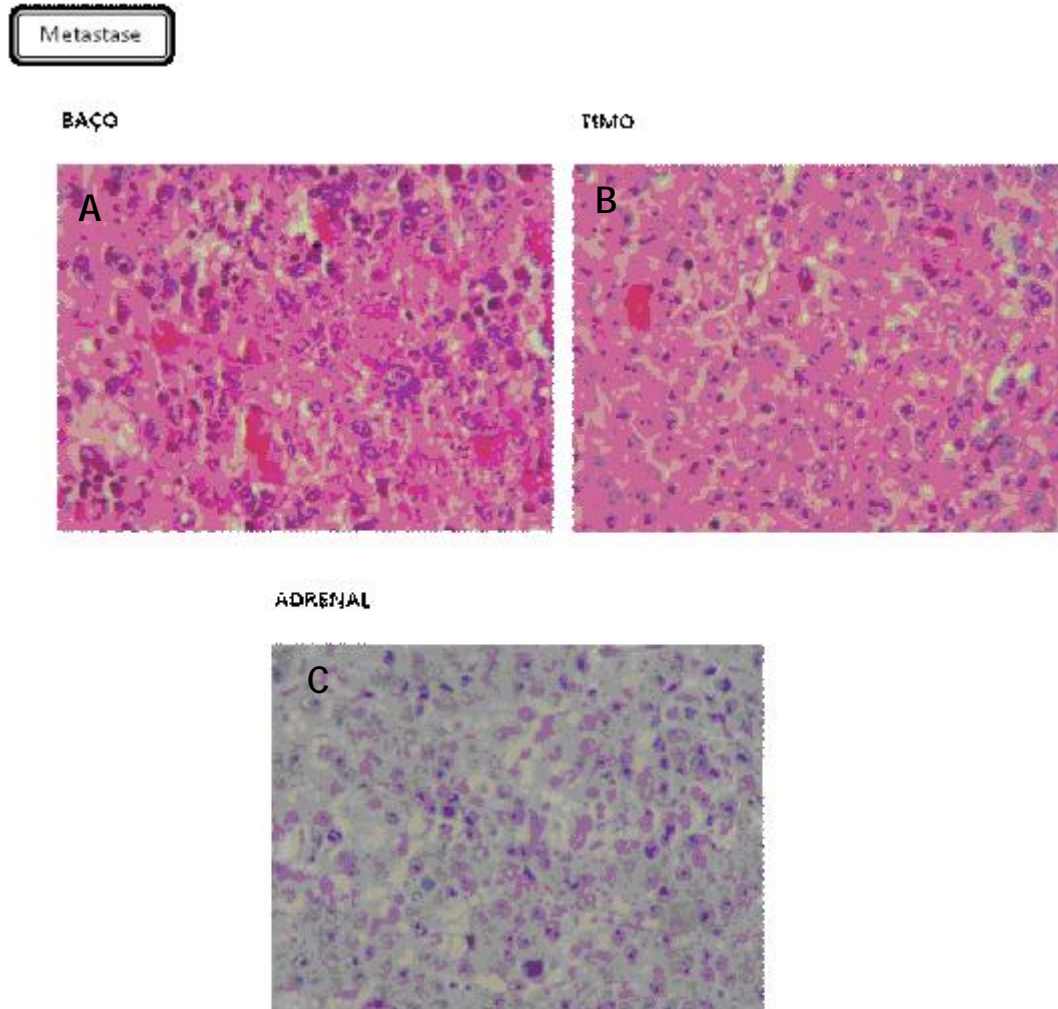


Figura 17 – Cortes histopatológicas corados com Hematoxilina & Eosina apresentando metástase no baço (A), timo (B) e adrenal (C) de ratos portadores de tumor Walker-256. É possível observar nos 3 cortes a presença de células metastáticas provenientes do tumor, com alterações no tamanho e forma das células. Algumas alterações encontradas: Pleomorfismo, hipercromasia, multinucleação, formas aberrantes (objetiva de 40x e zoom de 3x).

A avaliação dos níveis de corticosterona plasmática basal não demonstrou diferença significativa entre os grupos controle e tumor (figura 18A). Porém, após o teste de estímulo na avaliação da função da glândula adrenal, observou-se uma redução significativa no grupo tumor de aproximadamente 24% (figura 18B). Em valores absolutos de corticosterona plasmática basal e pós-estímulo com ACTH, o grupo controle apresentou diferença significativa maior que o grupo tumor ($p=0,0032$ e $p=0,0308$, respectivamente)(figura 18C).

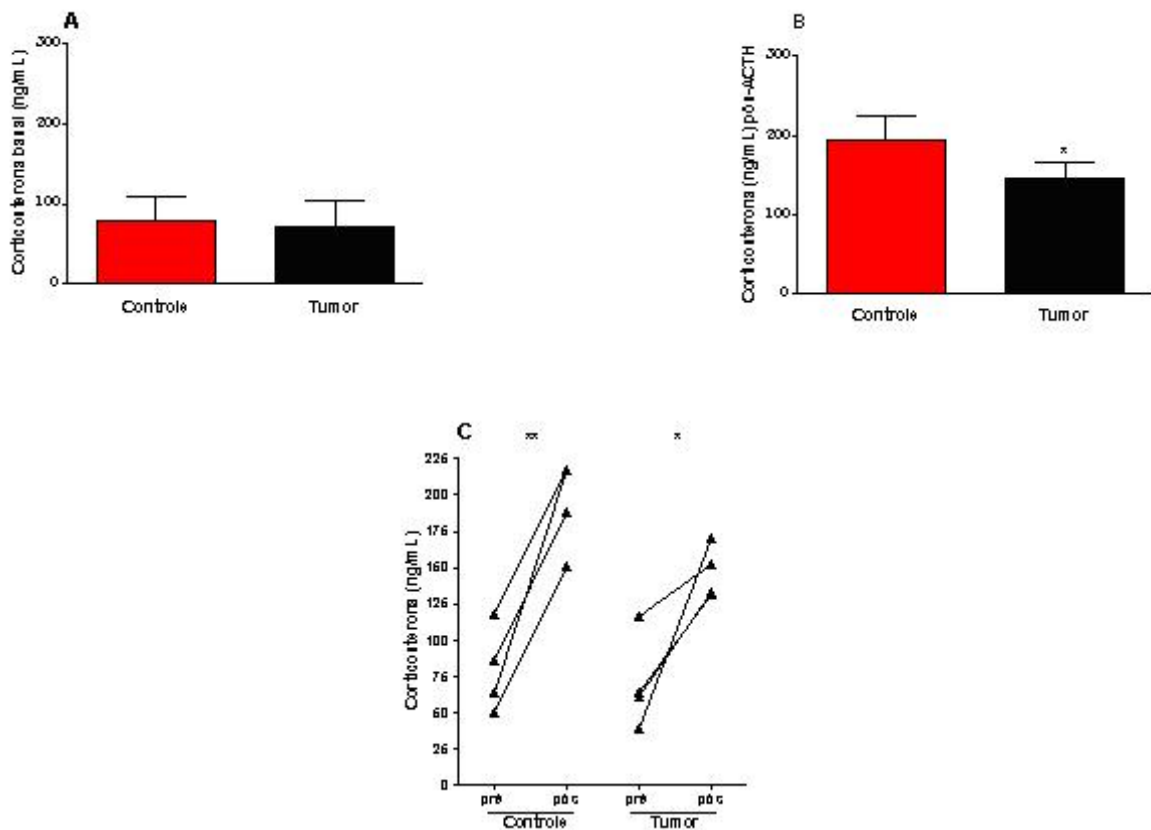


Figura 18 – Valores de corticosterona plasmática basal (A) e após teste de estímulo com ACTH (B) em ratos controle e portadores de tumor. Elevação da corticosterona plasmática por animal no teste de estímulo com ACTH nos mesmos grupos (C). Resultados analisados por teste *t Student*. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. $n = 4$.

De acordo com os resultados desse trabalho, não foi observada diferença significativa na concentração de colesterol total plasmático entre os grupos tumor e controle (figura 19A). Da mesma forma, os valores de correlação entre os dados de corticosterona plasmática pós-estímulo por ACTH e colesterol total plasmático nesses grupos não foram significativos (figura 19B).



Figura 19 – Concentração de colesterol total plasmático (A); diagrama de dispersão contendo os valores de corticosterona plasmática após o teste de estímulo com ACTH e os valores de colesterol total por animal (B). Resultados analisados por teste *t Student* (A) e coeficiente de correlação linear de Pearson e Spearman (B). n=3 a 4.

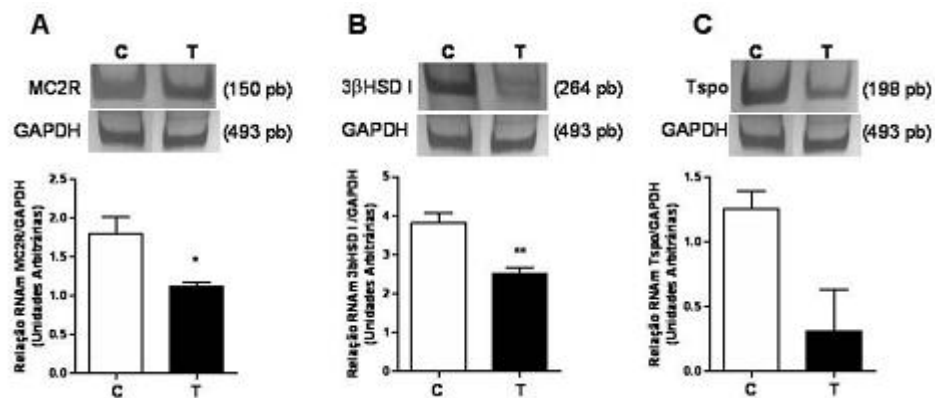


Figura 20 – Análise da expressão de genes da adrenal relacionados à esteroidogênese. Nos painéis superiores: fotografias representativas da eletroforese em gel de poliacrilamida 10% após RT-PCR. MC2R: receptor para melanocortina tipo 2; 3βHSD I: 3β desidrogenase I; Tspo: proteína translocadora; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Resultados analisados por ANOVA. C= grupo controle, T= grupo com tumor, pb= pares de bases. *p<0,05; **p<0,01 *versus* controle. n=3 a 4.

A figura 20 apresenta os resultados do estudo da expressão dos genes MC2R, 3βHSDI, Tspo e StAR localizados na glândula adrenal. A comparação da densitometria das bandas dos produtos de RT-PCR mostrou que houve redução significativa da expressão dos transcritos MC2R e 3βHSDI no grupo tumor em relação ao controle. A expressão do co-fator Tspo tendeu a ser menor no grupo

tumor, porém não houve diferença estatística significativa ($p=0,052$). A expressão do gene *StAR* foi variável nos grupos estudados.

Não foi observada diferença significativa no peso relativo da hipófise entre os grupos analisados, cujos valores absolutos foram de $7,6\pm 1,9$ mg para o tumor e $9,6\pm 2,5$ mg para o controle. Porém, ratos portadores de tumor apresentaram porcentagem de células produtoras de GH reduzidas em relação ao grupo controle (figura 21A). Pelo contrário, a porcentagem de células produtoras de TSH no grupo tumor foi significativamente maior que o controle (figura 21B). Não houve diferença significativa na porcentagem de células produtoras de ACTH e Prolactina entre os grupos analisados.

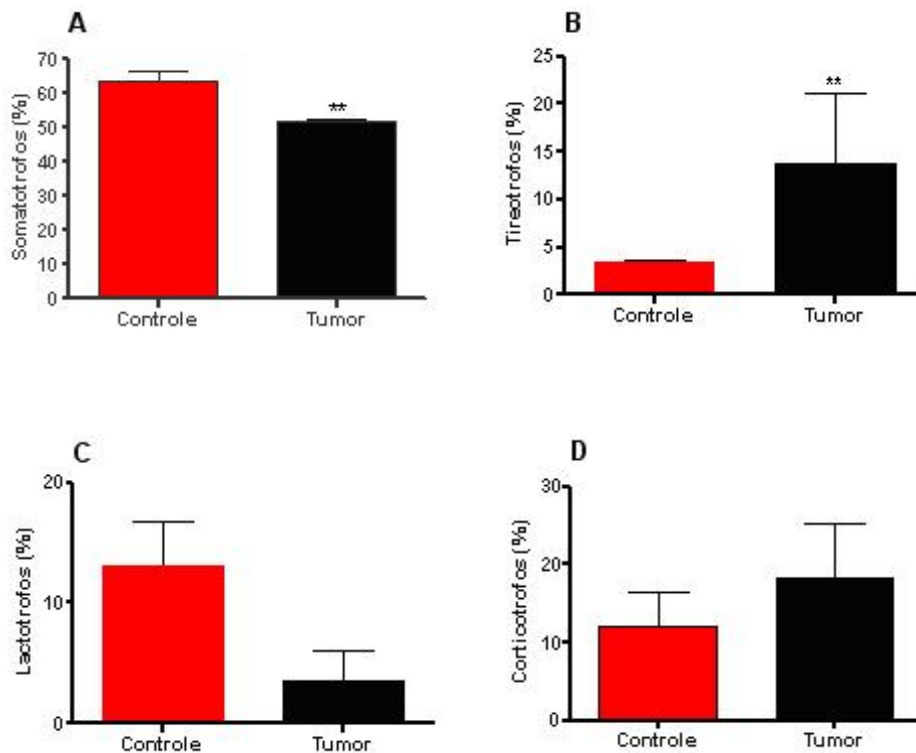


Figura 21 – Porcentagem de células da adeno-hipófise em ratos controle e portadores de tumor avaliadas através de análise combinada das colorações TH e AB-PAS-OG. A) Células produtoras de GH; B) Células produtoras de TSH; C) Células produtoras de prolactina; D) Células produtoras de ACTH. Resultados analisados por teste *t Student*. ** $p<0,01$ versus controle. $n=4$ a 5 .

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO DE ANIMAIS COM CAQUEXIA NEOPLÁSICA

4.2.1 Resposta Terapêutica na Evolução do Peso Corporal, Ingestão Alimentar, Progressão Tumoral e Caquexia

A variação diária do peso corporal relativa ao peso inicial, apresentada na figura 22 mostra que houve redução significativa do peso corporal dos animais dos grupos dexametasona antiinflamatória (Dex-AI) e dexametasona imunossupressora (Dex-IS) a partir do 7º dia até o 10º dia. A diminuição do peso verificada no 10º dia nos grupos Dex-AI e Dex-IS foi de 8% em relação ao grupo tratado com veículo.

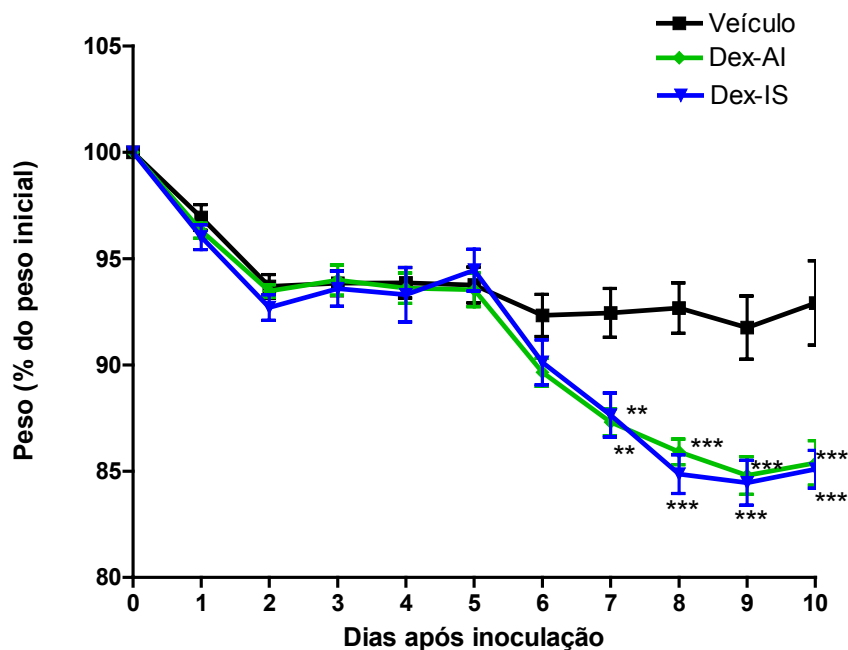


Figura 22 – Evolução do peso corporal diário (% do peso inicial) de ratos portadores de tumor tratados com: veículo, dexametasona em dose antiinflamatória (0,05 mg/Kg, Dex-AI) ou em dose imunossupressora (1 mg/Kg, Dex-IS) a partir do dia 5 dia até o 10º dia após inoculação das células tumorais. Resultados analisados por ANOVA two-way seguida de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus veículo. $n = 6$ a 10 .

Observando o gráfico do consumo de ração dos últimos 5 dias (figura 23) os tratamentos com dexametasona em dose antiinflamatória e imunossupressora não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo veículo, indicando que não houve redução da ingestão alimentar quando os ratos foram tratados com esses fármacos em diferentes doses.

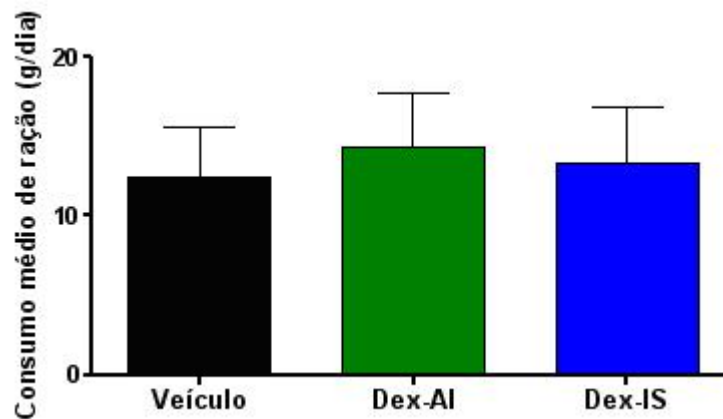


Figura 23 – Consumo médio de ração de ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI ou Dex-IS. Foi calculada a média de consumo dos últimos 5 dias após a inoculação das células tumorais. Resultados analisados por ANOVA one-way seguida de Newman-Keuls. n=6 a 10.

No que se refere à evolução tumoral, somente o grupo Dex-IS apresentou redução significativa em relação ao grupo veículo. Essa redução foi de aproximadamente 47%, 44% e 42% nos dias 6, 8 e 10, respectivamente, após inoculação das células tumorais (figura 24).

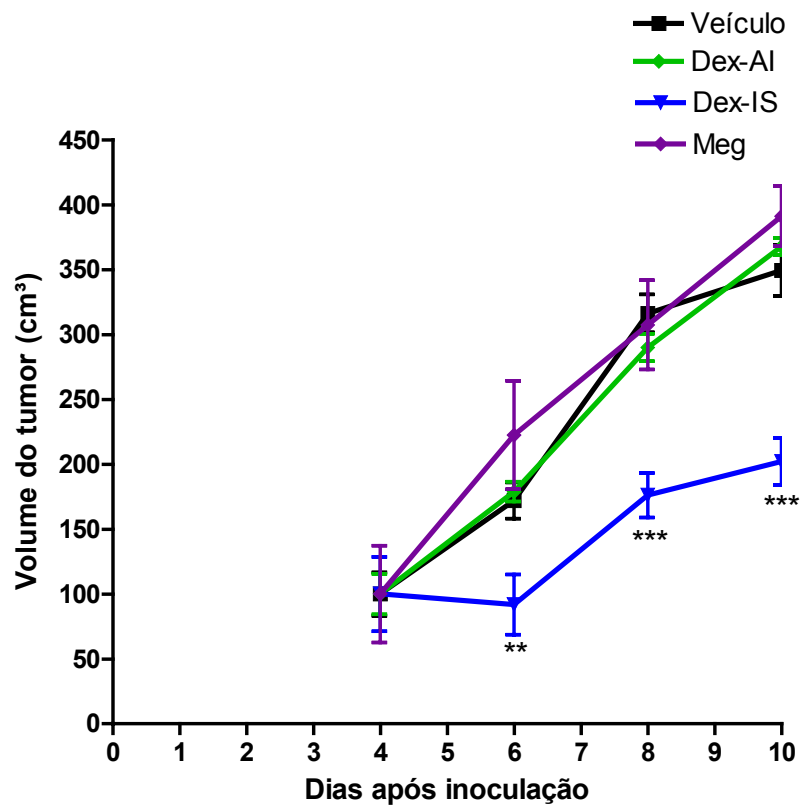


Figura 24 – Curva de progressão do volume tumoral (em %) a partir do 4º dia de inoculação em ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI ou Dex-IS e Meg. Resultados analisados por ANOVA two-way seguida de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus veículo. $n = 5$ a 10 .

Analisando a figura 25A, somente o grupo Dex-IS apresentou índice de perda de massa corpórea maior que 10%, mostrando que o tratamento por dexametasona em dose imunossupressora leva à caquexia. Além disso, o tratamento com dexametasona em dose antiinflamatória e imunossupressora apresentaram aumento significativo da porcentagem de perda de massa corpórea quando comparados ao grupo tratado com veículo. Por fim, o grupo Dex-IS apresentou aumento significativo da perda de massa corpórea em relação ao tratamento Dex-AI.

Ao analisar o efeito dos fármacos nos ratos com tumor (figura 25B) todos os grupos apresentaram caquexia (índice maior que 10%). Além disso

nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo.

O efeito do tumor sobre a caquexia neoplásica foi analisado após remover a fração de perda de peso correspondente ao efeito colateral de cada fármaco (figura 25C). Podemos observar que somente o grupo Dex-IS mostrou redução significativa em relação ao grupo tratado com veículo. Assim, o grupo Dex-IS apresentou porcentagem de perda de massa corpórea menor que 10%.

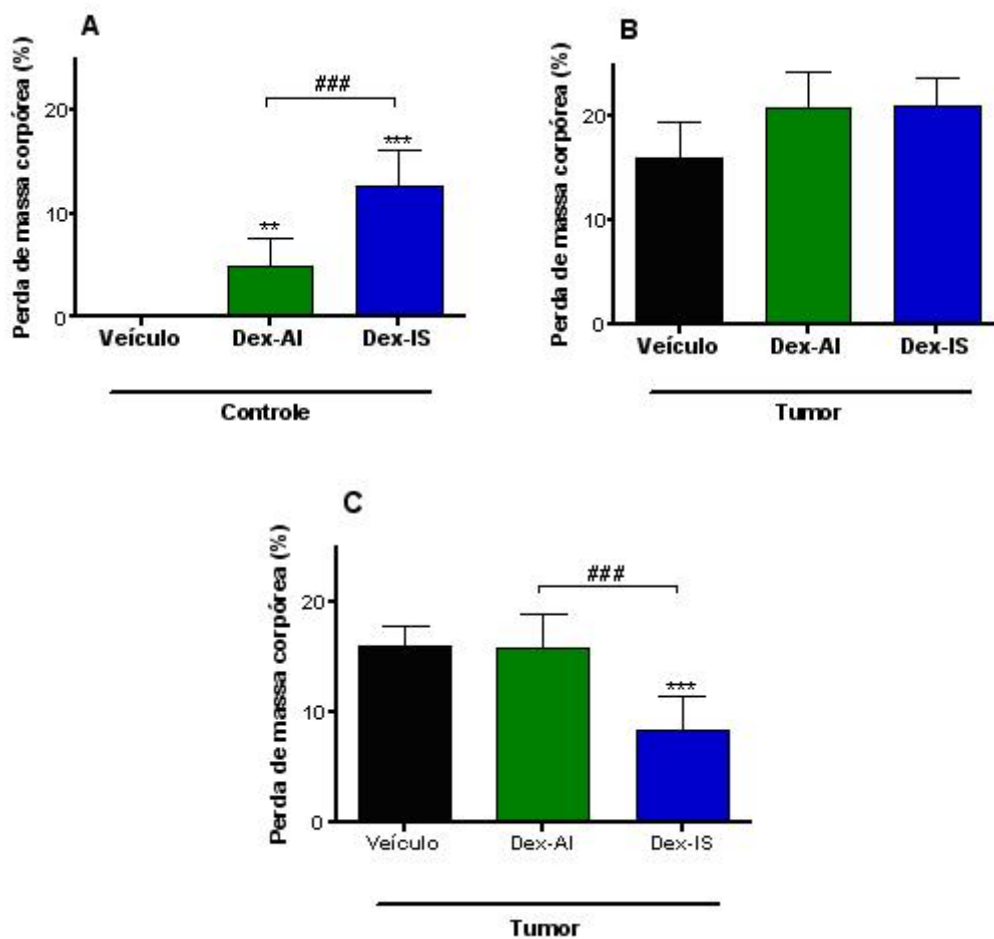


Figura 25 – Porcentagem de perda de massa corpórea calculada nos animais sob tratamento. A) Efeito do tratamento sobre ratos controle; B) Efeito do tratamento sobre ratos com tumor; C) Diferencial da perda de massa corpórea descontando o efeito do tratamento (B-A). Resultados analisados por ANOVA one-way seguida de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus veículo; ### $p < 0,001$. A caquexia foi avaliada através da perda de massa corpórea, calculada conforme descrito em materiais e métodos. $n = 3$ a 10 .

Ao analisar o índice de perda de massa corpórea do grupo tratado com megestrol, observou-se que o grupo controle tratado com veículo (óleo de milho via gavagem) apresentou índice de $9,86 \pm 8,98\%$; animais do grupo controle tratados com megestrol obtiveram índice de $7,67 \pm 1,53\%$ e o grupo de animais portadores de tumor Walker-256 tratados com megestrol apresentou índice de $14 \pm 8\%$.

4.2.2 Efeito do Tratamento Sobre o Sistema Imunológico

Houve uma redução significativa no peso relativo do baço dos grupos Dex-AI e Dex-IS em relação ao grupo veículo (figura 26). Essa redução foi de 28% no grupo Dex-AI e 46% no grupo Dex-IS, aproximadamente. Já o tratamento com megestrol não reduziu significativamente o peso do baço, quando comparado ao veículo. Na análise histopatológica do baço observou-se alterações características de imunossupressão (diminuição da celularidade das polpas, bem como diminuição do tamanho das polpas brancas) em 80% dos animais tratados com dexametasona em doses antiinflamatória e imunossupressora (tabela 5), enquanto que no grupo Meg e veículo (tumor) a imunossupressão ocorreu de forma mais branda (20 e 40%, respectivamente). Por outro lado, animais dos grupos veículo (tumor) e Meg apresentaram metástases esplênicas em 60% dos animais. Esse achado não foi observado nos outros grupos. Em relação a alteração morfológica e estrutural do baço observou-se que somente o grupo Dex-AI não apresentou diferença significativa em relação ao grupo veículo (controle).

Não se observou diferenças significativas no peso relativo do timo (dados não apresentados), apesar de ter sido encontrado células metastáticas em alguns animais dos grupos portadores de tumor.

Tabela 5 – Análise histopatológica do baço. Foi avaliada a alteração estrutural no órgão (*score*), e presença ou ausência de imunossupressão e metástases. Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão e em porcentagem do número total de animais. * $p < 0,05$ versus veículo (controle) dados analisados por teste de TUKEY. $n = 5$.

| Grupos | Alterações estruturais no baço | Imunossupressão | Metástase esplênica |
|--------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------|
| Veículo (controle) | 0 ± 0 | 0% | 0% |
| Veículo (tumor) | $2,2 \pm 1,20^*$ | 40% | 60% |
| Meg | $2,0 \pm 1,04^*$ | 20% | 60% |
| Dex-AI | $1,3 \pm 0,44$ | 80% | 0% |
| Dex-IS | $1,7 \pm 0,67^*$ | 80% | 0% |

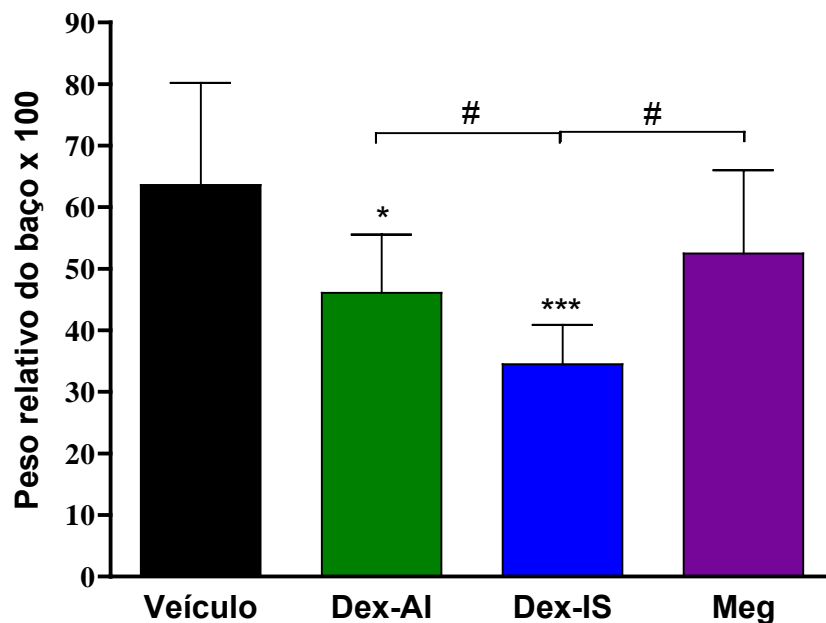


Figura 26 – Peso do baço relativo ao peso corporal do animal no momento do sacrifício, em ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI ou Dex-IS e Meg (subtraindo-se o peso do tumor do peso corporal total). Resultados analisados por ANOVA one-way seguida de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus veículo e # $p < 0,05$. $n = 5$ a 10.

Não foi observada diferença significativa na quantidade relativa de neutrófilos entre o grupo tratado com veículo ($86 \pm 5\%$) e os grupos Dex-AI ($90 \pm 4\%$), Dex-IS ($97 \pm 2\%$) e Meg ($81 \pm 13\%$). Da mesma forma, os valores da porcentagem de linfócitos também não apresentaram diferença significativa quando se comparou o

grupo veículo ($14\pm 5\%$) em relação aos tratamentos Dex-AI ($10\pm 4\%$), Dex-IS ($3\pm 2\%$) e Meg ($19\pm 5\%$).

4.2.3 Efeito do Tratamento Sobre o Eixo HPA

Ao analisar o peso relativo da glândula adrenal (figura 27), pode-se observar que houve uma diminuição estatisticamente significativa de 51% do grupo Dex-AI e 56% do grupo Dex-IS em relação ao grupo veículo. O grupo Meg não apresentou diferença significativa em relação ao veículo. Sobre a relação córtex/medula, nenhuma diferença significativa foi observada, quando comparado o veículo ($6,2\pm 1,3$ ua) com os tratamentos Dex-AI ($5,9\pm 2,3$ ua), Dex-IS ($6,6\pm 3,2$ ua) e Meg ($9,2\pm 4,2$ ua).

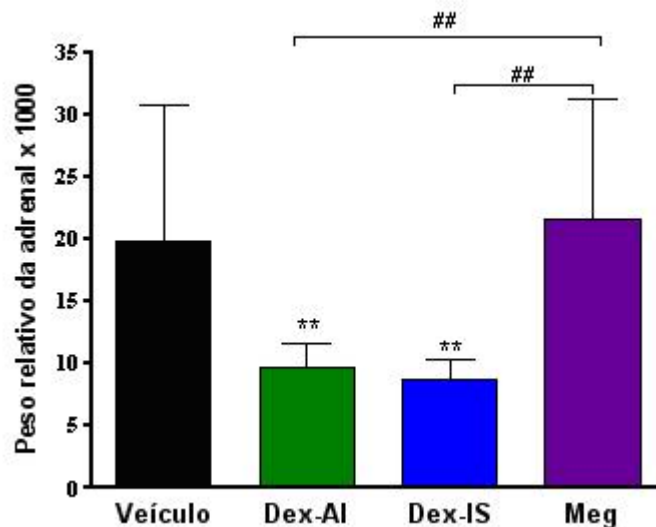


Figura 27 – Peso da adrenal relativo ao peso corporal do animal no momento do sacrifício, em ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI ou Dex-IS e Meg (subtraindo-se o peso do tumor do peso corporal total). Resultados analisados por ANOVA one-way seguida de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ versus veículo e ## $p < 0,01$. $n = 5$ a 10 .

Em relação à comparação do peso relativo da hipófise do grupo veículo e os grupos Dex-AI, Dex-IS e Meg, nenhuma diferença significativa foi observada (dados não apresentados). Em termos de peso absoluto da hipófise, os valores foram de $7,6 \pm 1,9$ mg para o grupo veículo; $9,1 \pm 1,5$ mg para Dex-AI; $7,6 \pm 1,5$ mg para Dex-IS e $8,1 \pm 0,7$ mg para Meg.

A figura 28 mostra a variação da porcentagem de células da adeno-hipófise em ratos do grupo veículo (controle), veículo (tumor), Dex-AI, Dex-IS e Meg. A proporção de células somatotróficas oscilaram entre 41 e 64%, as células lactotróficas ficaram na faixa de aproximadamente 3 a 19%, células tireotróficas compreenderam 4 a 18%, as células adenocorticotróficas ficaram entre 13 e 30% e as células gonadotróficas situaram-se entre 7 e 14%.

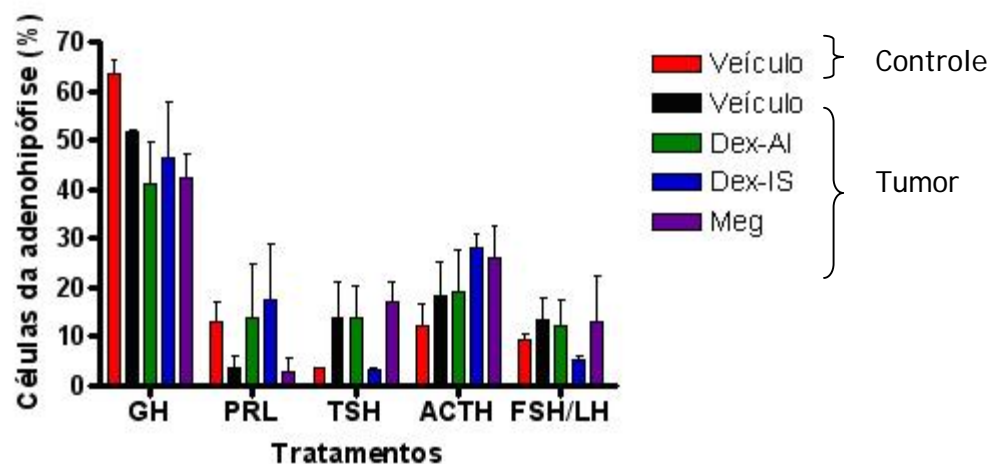


Figura 28 – Variação da porcentagem de diferentes tipos celulares da adeno-hipófise em grupo de ratos controle tratados com veículo e grupo de ratos tumor tratados com veículo, Dex-AI, Dex-IS, ou Meg. GH: hormônio do crescimento; PRL: prolactina; TSH: hormônio tireoestimulante; ACTH: hormônio adenocorticotrófico; FSH: hormônio folículo-estimulante; LH: hormônio luteinizante. n=4 a 5.

Os valores de corticosterona plasmática basal, demonstrados na figura 29A, mostram que houve uma redução significativa dos grupos Dex-AI e Dex-IS com valores de 82% e 86%, respectivamente, em relação ao grupo tratado com veículo. É interessante observar que mesmo o tratamento com dexametasona em

menor dose (antiinflamatória) já foi suficiente para causar inibição da corticosterona basal.

Resultado semelhante foi observado nos valores da corticosterona plasmática no teste de estímulo das glândulas adrenais após indução com ACTH (figura 29B). Ocorreu uma diminuição significativa de 79% no grupo Dex-AI enquanto que o grupo Dex-IS apresentou redução de 89%.

Já os ratos tratados com megestrol não apresentaram diferença significativa nas concentrações de corticosterona plasmática basal e pós-estímulo por ACTH, quando comparados ao grupo veículo.

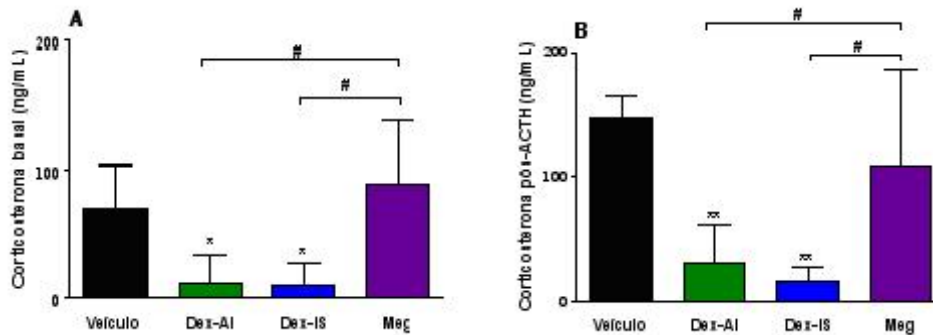


Figura 29 – Valores de corticosterona plasmática basal (A) e após teste de estímulo com ACTH (B) em ratos portadores de tumor tratados com: veículo, Dex-AI, Dex-IS ou Meg. Resultados analisados por ANOVA one-way seguida de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus veículo e # $p < 0,05$. $n = 3$ a 4.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentaram perda de peso e redução da ingestão alimentar em relação ao controle, nos últimos 5 dias após a inoculação das células tumorais. Dessa maneira, os animais do grupo tumor desenvolveram caquexia (perda de massa muscular maior que 10%) no dia do sacrifício (10^o). Esses resultados confirmam dados da literatura de que a linhagem de células tumorais LLC-WRC 256 do carcinossarcoma de Walker-256 é um excelente modelo experimental para indução da caquexia em ratos Wistar por possuir crescimento rápido (VICENTINO et al., 2002). Além disso, ocorre bloqueio da resposta fisiológica de ingestão alimentar (sensação de fome) com o avanço progressivo do crescimento do tumor, o que, associado à ação deletéria causada pela caquexia, leva à perda crônica de tecido adiposo e massa muscular, caracterizando a síndrome da anorexia-caquexia nesse modelo (MORRISON, 1972; GONÇALVES et al., 2006). A perda acentuada de peso observada em todos os grupos nos primeiros dois dias de tratamento pode ser devida à manipulação dos animais em estudo, visto que já foi observada perda semelhante após experimentos realizados com inoculação somente de PBS. A partir do 7^o dia da inoculação, houve redução significativa do peso dos animais tratados com dexametasona em doses antiinflamatória e imunossupressora, quando comparadas ao grupo com tumor tratado com veículo. Dados prévios confirmam que os glicocorticóides podem induzir à proteólise e conseqüentemente à perda de massa muscular devido à indução da expressão de miostatina, que é um fator regulatório negativo de síntese da massa muscular esquelética (MA et al., 2003). Além disso, as drogas de efeito glicocorticóide promovem inibição da síntese protéica, hiperglicemia e gliconeogênese a partir de aminoácidos e glicerol provenientes, respectivamente, da proteólise e lipólise dependendo da dose em que são utilizadas (BOUMPAS et al., 1993). Apesar da redução de peso desses animais, essa não esteve relacionada à redução da ingestão alimentar nesses grupos ($p > 0,05$).

O megestrol é um esteróide sintético da classe das progestinas que possui como efeito colateral o ganho de peso. Nos centros oncológicos, essa droga tem sido usada em adultos a fim de aumentar o apetite e preservar a massa

corpórea. Além disso, pode ser utilizada em adultos com câncer metastático de mama e câncer endometrial por suas propriedades antitumorais. A inibição de citocinas e indução do apetite em nível hipotalâmico pode ser um dos seus mecanismos de ação (MANTOVANI et al., 1998; MCCARTHY et al., 1994). Outra hipótese se refere à reatividade cruzada do megestrol sobre a estimulação dos receptores para glicocorticóides (GR), levando ao aumento da fome (LUNDGREN et al., 1996). O megestrol possui alta afinidade para esses receptores citossólicos, com capacidade de ligação correspondendo à metade daquela que ocorre com a dexametasona, e o dobro da afinidade se comparado ao cortisol (KONTULA et al., 1983). A ligação do megestrol ao GR, porém, não parece promover os efeitos sistêmicos e imunossupressores característicos dos glicocorticóides. Isso evidencia a necessidade de estudo dos mecanismos que levam a esses efeitos colaterais causados pelos glicocorticóides na ligação aos seus receptores (BAMBERGER et al., 1999). A redução da ingestão alimentar e do peso dos animais tratados com megestrol observada em nossos resultados (dados não apresentados) não parece estar relacionada a mecanismos centrais de anorexia; decorre, provavelmente, do tipo de via de administração utilizada para o tratamento dos animais durante o experimento. A utilização da gavagem para aplicação de 2 doses diárias causou agressão esofágica inibindo a alimentação ao longo do experimento. Tal hipótese foi confirmada pelo tratamento de animais controle apenas com o veículo (óleo de milho) utilizando a mesma via de administração, apresentando índice de perda de massa corpórea de $9,86 \pm 8,98\%$. A administração de megestrol através de uma via alternativa, menos agressiva, resultaria possivelmente em aumento do consumo de ração desses animais e, conseqüentemente, aumento do peso e melhor índice de perda de massa corpórea.

Foi possível observar em nossos estudos que o tratamento com dexametasona em dose imunossupressora do grupo de ratos sem tumor foi capaz de causar caquexia. Assim, esses dados confirmam a hipótese de que o tratamento prolongado com drogas de grande potência glicocorticóide, como a dexametasona, pode desenvolver caquexia através de efeitos lipolíticos, proteolíticos e atrofia muscular (BOUMPAS et al., 1993; DARDEVET et al., 1995). Portanto, na presença de tumor, a caquexia neoplásica é acrescida à caquexia iatrogênica causada pelo glicocorticóide utilizado em altas doses.

De acordo com dados apresentados em nosso trabalho, animais portadores de tumor Walker-256 apresentaram baço de tamanho aumentado em relação ao controle. A esplenomegalia pode ser explicada, pela infiltração de células metastáticas provenientes do tumor de Walker-256, pois a análise do sangue periférico indicou a presença de células tumorais em todos os grupos de animais portadores de tumor. Além disso, foram observadas metástases esplênicas em 60% dos animais do grupo tumor. Bergsagel et al (1968) demonstraram que a quantidade de colônias de células tumorais (tumor de célula plasmática: Adj. PC-5) presentes no baço foi diretamente proporcional à concentração de células tumorais inoculadas na circulação sanguínea de camundongos. Além disso, pode estar havendo maior apresentação de antígenos de células tumorais aos macrófagos e células dendríticas, pois o baço é o principal sítio onde ocorrem as respostas imunes aos antígenos provenientes do sangue (MACLENNAN, 1994).

Verificamos que o tratamento com dexametasona nas doses antiinflamatória e imunossupressora preveniu o aumento do baço. Os glicocorticóides possuem amplo efeito antiinflamatório e regulador da resposta imune do hospedeiro. Essas drogas diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, além de diminuir a migração de leucócitos para locais de inflamação por inibir a expressão de moléculas de adesão e seus receptores e promovendo a apoptose de leucócitos, limitando a magnitude da resposta inflamatória. Esses efeitos podem amenizar a resposta inflamatória e imune em órgãos linfóides secundários, como o baço, prevenindo o aumento do tamanho (RHEN; CIDLOWSKI, 2005). Em relação aos órgãos linfóides primários, foi observada perda da arquitetura estrutural do timo em todos os grupos de ratos portadores de tumor, causada principalmente por invasão tumoral. Desse modo, tornou-se impossível a interpretação do padrão de resposta celular do timo, habitualmente verificada pela relação de celularidade entre córtex e medula.

Em termos de leucócitos circulantes, nossos dados mostraram que ratos portadores de tumor possuem elevação da porcentagem de neutrófilos circulantes, enquanto que a porcentagem de linfócitos está reduzida. Nossos dados prévios mostraram que ratos portadores de tumor Walker-256 possuem neutrofilia e linfopenia no 12º dia a partir da inoculação das células tumorais, além de leucocitose absoluta (FONSECA et al., 2008) em relação ao controle. Neutrofilias podem ser

resultantes de processos fisiológicos como gravidez, estresse, neutrofilia do recém-nascido, bem como processos infecciosos, inflamatórios e necrose tissular (KORPPI et al., 1993). A inflamação causada pela presença do tumor pode resultar na produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (GUTTRIDGE et al., 2000). Segundo Denis e Chadee (1989), a produção aumentada de IFN- γ e TNF- α em processos inflamatórios podem induzir à ativação e aumento do número de neutrófilos na circulação sanguínea. A linfopenia observada em nossos resultados pode ser apenas relativa devido ao aumento de leucócitos às custas de neutrófilos. Porém, linfopenias verdadeiras ou absolutas podem ocorrer devido à destruição morfológica e funcional do timo. Esse órgão linfóide primário é responsável pela maturação dos linfócitos provenientes da medula óssea, que começam a receber marcadores de superfície e receptores para antígenos para depois serem liberados na corrente sanguínea (CORY, 1995). Lima et al (2005) observaram que ratos portadores de tumor Walker-256 apresentavam maior quantidade de apoptose de linfócitos em relação a ratos controle. Esses dados foram confirmados através da análise de integridade de membrana, DNA, despolarização de membrana mitocondrial e expressão de genes anti-apoptóticos e pró-apoptóticos. Vale ressaltar que a corticosterona endógena também possui efeitos sobre o número de linfócitos, o que pode ter ocorrido na fase inicial de resposta ao câncer. A ação inibitória do tráfego de linfócitos circulantes, através da inibição da expressão de moléculas de adesão e seus respectivos receptores, bem como a supressão da ativação de linfócitos, especialmente os linfócitos Th1, e a apoptose de células linfóides podem ser atribuídas a substâncias com efeito glicocorticóide (BARNES, 2006; RHEN; CIDLOWSKI, 2005; BOUMPAS et al., 1993).

As adrenais de animais portadores de tumor apresentaram aumento significativo em relação ao controle. Possivelmente, esse aumento foi devido à hiperplasia da glândula em resposta ao estresse agudo com estímulo do eixo HPA causado pelo crescimento tumoral desde o início do experimento. Ulrich-Lai et al (2006) demonstraram que o estresse crônico poderia causar aumento do peso das glândulas adrenais através do aumento do tamanho e número de células em uma região específica do córtex, a zona fasciculada. Esse aumento pode ser explicado pela produção aguda aumentada de corticosterona pelas células dessa camada em resposta ao ACTH. Svaninger et al. (1987) demonstraram que animais portadores de tumor possuíam uma excreção urinária elevada de glicocorticóides devido ao

estresse causado pela anorexia. Em humanos, evidências de altos níveis de cortisol e catecolaminas plasmáticas foram relatados em pacientes com câncer (RUSSEL et al., 1984; SCHAUR et al., 1979). Além disso, foi relatado que adultos sofrendo de desnutrição protéico-calórica poderiam mostrar sinais de aumento da atividade do eixo HPA (SMITH et al., 1975). Nossos resultados prévios em animais portadores de tumor Walker-256, sem evidências de doença metastática avançada, demonstraram aumento das adrenais devido à hipertrofia da região cortical (aumento da relação córtex/medula) que é compatível com o efeito do estresse crônico (FONSECA et al., 2008). No presente trabalho, não houve diferença significativa na relação córtex/medula de animais portadores de tumor comparados ao grupo controle indicando um aumento proporcional de ambos. De acordo com dados da literatura, a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo pode estimular a secreção de norepinefrina pelas células cromafins da medula adrenal através de receptores específicos (SAPER et al., 1976; CHROUSOS et al., 1992). Além disso, os glicocorticóides são necessários para a sobrevivência e manutenção das células cromafins, assim como pela produção de epinefrina por essas células. Outro fator que contribuiu para o aumento do tamanho da adrenal foi a presença de células tumorais metastáticas observadas nesse órgão, sem no entanto destruir a arquitetura histológica.

Nossos resultados demonstraram que no 10^o dia após inoculação tumoral (no momento do sacrifício) os animais não se encontravam em estado de hiperfunção do córtex adrenal. Desse modo, não foi observada diferença significativa entre os valores de corticosterona plasmática basal dos grupos controle e tumor. Porém, os valores de corticosterona pós-estímulo por ACTH foram significativamente menores no grupo tumor, quando comparados ao grupo controle. As possíveis explicações para a disfunção adrenal seriam: insuficiência primária da glândula adrenal, falência hipofisária (falta de estímulo pelo ACTH), ou ambas provocadas pelo estresse crônico. Zepp et al (1983) demonstraram que ratos portadores de carcinoma de Walker-256 apresentavam concentrações plasmáticas de ACTH e corticosterona progressivamente diminuídas com o passar do tempo. A diminuição significativa da expressão gênica do MC2R e enzima 3 β HSDI, além da tendência de diminuição do co-fator Tspo, participantes da cascata da esteroidogênese que leva à produção de corticosterona, confirmam a hipofunção da glândula adrenal. Ratos portadores de tumor não apresentaram diferença significativa nos valores de

colesterol total plasmático, apesar de uma tendência à queda. Cassola et al (2008) demonstraram que ratos portadores de tumor Walker-256 tendem a níveis diminuídos de colesterol plasmático a partir do 11º dia do desenvolvimento tumoral. Estudos anteriores também relatam uma diminuição de 43% na concentração plasmática de colesterol em ratos com caquexia relacionada ao câncer, além de apresentarem níveis de HDL diminuídos (PIZATO et al., 2005; DESSI et al., 1991). Segundo Shaw (2006), o estresse causado pela caquexia pode inativar a HMG-CoA-redutase, enzima necessária para a síntese de colesterol.

De acordo com nossos resultados, o tratamento com dexametasona nas doses antiinflamatória e imunossupressora promoveram diminuição do tamanho da glândula adrenal, além de diminuir a concentração plasmática de corticosterona basal e pós-estímulo por ACTH, quando comparados com o grupo de animais portadores de tumor tratados com veículo. Nessa circunstância, o glicocorticóide exógeno exerceu retrocontrole negativo sobre o hipotálamo e hipófise, inibindo a produção de CRH e ACTH, respectivamente. Estudos mostram que pequenas doses de dexametasona (1 mg em dose única) é capaz de suprimir a produção de cortisol pelo córtex adrenal de humanos em níveis abaixo de 1,8 µg/dL por no mínimo 8 horas (IDELMAN et al., 2000). Segundo a literatura, a administração de corticosteróides promove a supressão da função endógena adrenocortical e a terapia prolongada, principalmente com altas doses, pode ocasionar atrofia adrenal (SMYTH et al., 1960; INGLE; KENDALL, 1937). O tratamento prolongado com corticosteróides resulta em redução mais acentuada da resposta do córtex adrenal à administração de ACTH do que a terapia a curto-prazo (FREDELL et al., 1955). Já no grupo Meg, as concentrações de corticosterona plasmática basal e pós-estímulo por ACTH não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo veículo. Dessa maneira, o megestrol não promoveu disfunção cortico-adrenal basal, porém houve perda de resposta após estímulo com ACTH, indicando falha na resposta ao estresse, possivelmente devido ao efeito sobre os GRs.

Em relação à morfologia hipofisária, não houve diferença de tamanho da glândula nem de população de corticotrofos e lactotrofos nos animais portadores de tumor em relação ao controle. Além disso, os níveis de ACTH não são conhecidos nesses animais, visto que esse peptídeo é bastante lábil e sua dosagem seria muito onerosa. O presente trabalho mostra que animais portadores de tumor apresentaram diminuição da porcentagem de células somatotrópicas, quando

comparados ao grupo controle. A literatura relata o aumento da porcentagem de células produtoras de GH em resposta ao estresse agudo, decrescendo essa quantidade quando evolui para a cronicidade (DORSHKIND; HORSEMAN, 2001). Além disso, os animais portadores de tumor apresentaram elevação da porcentagem de células tireotróficas, em relação ao grupo controle. Provavelmente esses animais estejam com a síndrome do eutireóideo doente, caracterizada pela secreção anormal dos hormônios tireoideanos na ausência de doença primária da tireóide. Compreende basicamente a síndrome do T_3 baixo e, em condições de extrema gravidade, com queda nos níveis de T_4 . Ocorre em pacientes hospitalizados nas mais diversas condições como sepse, traumas, cirurgias, doença, câncer e transplantados (MCLVER; GORMAN, 1997) e os níveis diminuídos de T_3 e T_4 nesses pacientes provavelmente ocorrem por uma disfunção neuroendócrina causada pelo estresse e está relacionada à ação de citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α) (DOCTER, 1993). O valor do TSH nessa síndrome é controverso e podem ser encontrados valores diminuídos, normais ou elevados. Porém alguns trabalhos relatam que a elevação de TSH na síndrome do eutireóideo doente é indicativa de mau prognóstico estando relacionada à doença mais grave e óbito (LODHA et al., 2007; JOOSTEN et al., 2000). A produção de citocinas pró-inflamatórias em animais portadores de tumor Walker-256 em estágio avançado pode estar contribuindo para o comprometimento do sistema neuroendócrino e desenvolvimento dessa síndrome. Além disso, o aumento da porcentagem de tireotrofos em um momento da evolução tumoral observado em nossos resultados pode indicar a severidade da doença. Desse modo, as alterações encontradas na celularidade da adeno-hipófise sugerem que os animais portadores de caquexia tumoral apresentaram respostas neuroendócrinas adaptativas após passar pela fase de resposta aguda.

Foi possível observar em nossos resultados que somente o tratamento com dexametasona em dose imunossupressora foi capaz de prevenir o desenvolvimento tumoral. Como já foi mencionado, algumas citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-6 são mediadores importantes no desenvolvimento tumoral e progressão da caquexia no câncer (MARNETT, 1981). Estudos revelaram que a inibição da síntese de prostaglandinas e dessas citocinas com anticorpos específicos diminuiu a progressão tumoral e a caquexia causada pelo câncer (GELIN et al., 1991). A utilização de drogas com essas propriedades seria útil para o controle do desenvolvimento de neoplasias malignas, bem como a diminuição de seus efeitos

deletérios. Estudos clínicos confirmam também que o tratamento com glicocorticóides em curto prazo é uma ferramenta importante para a diminuição dos sintomas progressivos causados pelo crescimento tumoral (BRUERA et al., 1985; POPIELA et al., 1989). Dessa maneira, drogas com efeito glicocorticóide, como a dexametasona, podem ser utilizadas no controle de alguns tipos de câncer, como o câncer de mama, de próstata e gastro-intestinal (OSBORNE et al., 1979; KEITH, 2008). O mecanismo pelo qual isso acontece inclui o efeito direto sobre a proliferação das células tumorais, a diminuição da neovascularização em tumores primários e secundários, além da preservação de recursos do hospedeiro contra o tumor (MARNETT, 1992). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram a presença de receptores para glicocorticóides com alta afinidade em tumores malignos usualmente não considerados hormônio-dependentes, mostrando a capacidade de ação das drogas glicocorticóides sobre esses tumores. Exemplos de tumores que apresentam receptores para glicocorticóides são carcinoma de cólon, lipossarcomas e sarcomas de tecidos moles (CHAUDHURI et al., 1980; WALKER et al., 1986). Outros efeitos incluem a inibição da fosfolipase A2, ciclooxigenase 2 e óxido nítrico sintase 2 que resulta na diminuição da produção de substâncias que são essenciais para a resposta inflamatória (NAKANO et al., 1990; O'BANION et al., 1992; MONCADA et al., 1993).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- O desenvolvimento de câncer avançado causou a SAC, caracterizada por diminuição do peso corporal e anorexia. Os tratamentos com diferentes doses de dexametasona aumentaram a perda de peso, sem influenciar na ingestão alimentar.

- Baseado na perda de massa corpórea, o tratamento com dexametasona causou caquexia somente na dose imunossupressora, independente da presença do tumor.

- Em relação ao sistema imune, a presença de tumor causou esplenomegalia, que poderia ser atribuído à reação inflamatória frente ao tumor ou à presença de metástase, verificada no esfregaço sanguíneo e baço. O tratamento com as doses antiinflamatória e imunossupressora de dexametasona preveniram o aumento do baço. A presença do tumor causou neutrofilia e linfopenia, além de destruição estrutural do timo.

- Animais portadores de tumor apresentaram adrenal de tamanho aumentado, possivelmente devido à hiperplasia do córtex adrenal decorrentes do aumento da corticosterona em resposta ao estresse agudo, aumento da região medular, além da presença de metástases e reação inflamatória causada pelo tumor. O tratamento com doses antiinflamatória e imunossupressora de dexametasona preveniram o aumento da adrenal, sugerindo o efeito inibitório dos glicocorticóides sobre o córtex adrenal.

- Ratos com tumor apresentam redução da resposta adrenal frente ao estímulo por ACTH, caracterizando a fase tardia da resposta de estresse ou exaustão adrenal, compatível com a expressão reduzida de genes relacionados à função do córtex adrenal. Os tratamentos com dexametasona em dose antiinflamatória e imunossupressora inibiram a função adrenal, conforme esperado pelo seu efeito farmacológico inibitório sobre o eixo HPA. O tratamento com megestrol não apresentou disfunção cortico-adrenal basal, porém houve perda de

resposta após estímulo com ACTH, indicando falha na resposta ao estresse, possivelmente devido ao efeito sobre os GRs.

- A presença de caquexia neoplásica esteve relacionada à diminuição da porcentagem de células somatotrópicas na hipófise (característica da fase crônica), além do aumento da porcentagem de células tireotrópicas (síndrome do eutireóideo doente).

- Somente o tratamento com dexametasona em dose imunossupressora foi capaz de prevenir a progressão tumoral em ratos portadores de tumor Walker-256. Por outro lado, não houve benefício terapêutico sobre a SAC com o uso de dexametasona em dose antiinflamatória.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADE, I. G.; CLARKE, T. R., et al. The mouse 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase multigene family includes two functionally distinct groups of proteins. **Mol. Endocrinol.**, V. 9, n. 9, p.1214-22, 1995.
- ACHARYYA, S.; LADNER, K. J.; NELSEN, L.; DAMRAUER, J.; REISER, P. J.; SWOAP, S.; GUTTRIDGE, D. C. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. **J. Clin. Invest.**, V. 114(3), p. 370-8, 2004.
- AKINGBEMI, B. T.; SOTTAS, C. M.; KOULOVA, A. I.; KLINEFELTER, G. R.; HARDY, M. P. Inhibition of Testicular Steroidogenesis by the Xenoestrogen Bisphenol A Is Associated with Reduced Pituitary Luteinizing Hormone Secretion and Decreased Steroidogenic Enzyme Gene Expression in Rat Leydig Cells. **Endocrinol.**, V. 145(2), p. 592-603, 2004.
- ANDERSEN, D. H. The effect of food and of exhaustion on the pituitary, thyroid, adrenal and thymus glands of the rat. **J. Physiol.**, V. 85(2), p.162-67, 1935.
- ARIYOSHI, N.; KIM, Y. C., et al. Characterization of the rat Star gene that encodes the predominant 3.5-kilobase pair mRNA. ACTH stimulation of adrenal steroids in vivo precedes elevation of Star mRNA and protein. **J. Biol. Chem.**, V.273, n.13, p.7610-9, 1998.
- ARGILES, J. M.; ALMENDRO, V.; BUSQUETS, S.; LOPEZ-SORIANO, F. J. The pharmacological treatment of cachexia. **Curr. Drug Targets**, V. 5, p. 265–77, 2004.
- BAKER, B. L. Cellular Composition of the Human Pituitary Pars tuberalis as Revealed by Immunocytochemistry. **Cell Tiss. Res.**, V. 182, p. 151-163, 1977.
- BAMBERGER, C. M.; ELSE, T.; BAMBERGER, A. M., et al. Dissociative glucocorticoid activity of medroxyprogesterone acetate in normal human lymphocytes. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, V. 84, p. 4055–61, 1999.
- BARNES, P. J. Corticosteroids: The drugs to beat: a review. **European Journal of Pharmacology**, V. 533, p. 2–14, 2006.
- BENCOSME, S. A; LECHAGO, J. Staining procedures for the endocrine cells of the upper gastrointestinal mucosa: Light-electron microscopic correlation for the gastrin-producing cell. **J. Clin. Path.**, V. 26, p. 427-434, 1973.

BENJAMIN, M. The ACTH cells in the pituitary gland of the nine-spined stickleback, *Pungitius pungitius* L. **J. Anat.**, V. 135, p. 155-164, 1982.

BERGSAGEL, D. E.; VALERIOTE, F. A. Growth Characteristics of a Mouse Plasma Cell Tumor. **Cancer research**, V. 28, p. 2187-2196, 1968.

BERTEVELLO, P. S.; SEELAENDER, M. C. L. Heterogeneous response of adipose tissue to cancer cachexia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, V. 34 p. 1161-7, 2001.

BHASIN, S.; TAYLOR, W. E.; SINGH, R., *et al.* The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. **J. Gerontol. Med. Sci.**, V. 58A, p. 1103–10, 2003.

BLISS, E. L.; SANDBERG, A. A.; NELSON, D. H.; EIK-NES, K. The normal levels of 17-hydroxycorticosteroids in the peripheral blood of man. **J. Clin. Invest.**, V. 32, p. 818, 1953.

BOTELLA, J.; PORTHE-NIBELLE, J.; PARIS, J.; LAHLOU, B. Interaction of new 19 nor progesterone derivatives with progestagen, mineralocorticoid and glucocorticoid cytosolic receptors. **J. Pharmacol.**, V. 17, p. 699–706, 1986.

BOUMPAS, D. T.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L.; CUPPS, T. R.; BALOW, J. E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **Ann. Intern. Med.**, V. 119, p. 1198-208, 1993.

BRUERA, E.; ROCA, E.; CEDARO, L.; CARRARO, S.; CHACON, R. Action of oral methylprednisolona in terminal câncer patients: a prospective randomized Double-blind study. **Cancer Treat. Rep.**, V.69, p. 751-54, 1985.

CABRAL, E. L. B.; CORREIA, M. I. T. D. Princípios nutricionais na abordagem do câncer avançado. In: Waitzberg DL. **Dieta, Nutrição e Câncer**, São Paulo: Atheneu, p. 329-33, 2004.

CASSOLA, P. Alterações metabólicas na caquexia induzida por tumor Walker-256 em ratos: anormalidades de parâmetros plasmáticos e hepáticos. 2008. 99f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

CHAPMAN, L. F.; GOODELL, H. The participation of the nervous system in the inflammatory reaction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, V. 116, p. 990-1017, 1963.

CHAUDHURI, P. K.; WALKER, M. J.; BEATTIE, C. W.; DAS GUPTA, T. K. Presence of steroid receptors in human soft tissue sarcomas of diverse histological origin. **Cancer Res.**, V. 40, p. 861-65, 1980.

CHROUSOS, G. P. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: the corticotropin-releasing hormone perspective. **Endocrinol Metab Clin. North Am.**, V. 21, p. 833-58, 1992.

CHROUSOS, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. **N. Engl. J. Me.**, V. 332, p. 1351-62, 1995.

CLARK, A. J.; BAIG, A. H.; NOON, L.; SWORDS, F. M.; HUNYADY, L.; KING, P. J. Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, V. 994, p. 111-117, 2003.

COCHAND-PRIOU, B., *et al.* Thyroid fine needle aspiration: the morphological features on thin prep slide preparations: eighty cases with histological control. **Cytopathology**, V. 14, P. 343-9, 2003.

CORY, S. Regulation of lymphocyte survival by the BCL-2 gene. **Annual Review of Immunology**, V. 13, p. 513-543, 1995.

CRONSTEIN, B. N.; KIMMEL, S. C.; LEVIN, R. I.; MARTINIUK, F.; WEISSMANN, G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intracellular adhesion molecule 1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, V. 89, p. 9991-5, 1992.

DARDEVET, D.; SORNET, C.; TAILLANDIER, D.; SAVARY, I.; ATTAIX, D.; GRIZARD, J. Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. **J. Clin Invest.**, V. 96, p. 2113-2119, 1995.

DAVID, A.; EDWARDS, K.; FELLOWES, K. P.; PLUMMER, J. M.; Anti-ovulatory and other biological properties of megestrol acetate 17 α -acetoxy-6-methylpregna-4,6-diene-3,20-dione (B.D.H.1298). **J. Reprod. Fertil.**, V.5, p. 331-346, 1963.

DAVIS, M. P.; DREICER, R.; WALSH, D.; LAGMAN, R.; LEGRAND, S. B. Appetite and cancer-associated anorexia: a review. **J. Clin. Oncol.**, V. 22(8) p. 1510-7, 2004.

DENIS, M.; CHADEE, K. Human Neutrophils Activated by Interferon- γ and Tumour Necrosis Factor- α Kill *Entamoeba histolytica* Trophozoites In Vitro. **Journal of Leukocyte Biology**, V. 46, p. 270-274, 1989.

DESSI, S.; BATETTA, B.; ANCHISI, C. Cholesterol metabolism in normal and neoplastic cell proliferation. **Arch. Gerontol. Geriatr.**, V. 2, p. 563-68, 1991.

DOCTER, R. The sick euthyroid syndrome: changes in thyroid hormone serum parameters and hormone metabolism. **Clin. Endocrinol.**, V. 39(5), p. 499-518, 1993.

DORSHKIND, K.; HORSEMAN, N. D. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. **BioEssays**, V. 23, p. 288-294, 2001.

EWAN, R. G. Effect of Selenium on Rat Growth, Growth Hormone and Diet Utilization. **J. Nutr.**, V. 106, p. 702-709, 1975.

EWART, H. S.; SOMWAR, R.; KLIP, A. Dexamethasone stimulates the expression of GLUT1 and GLUT4 proteins with different signaling pathways in L6 skeletal muscle cells. **FEBS Lett.**, V. 425, p. 179-83, 1998.

FERRANDO, A. A.; STUART, C. A.; SHEFFIELD-MOORE, M.; WOLFE, R. R. Inactivity amplifies the catabolic response of skeletal muscle to cortisol. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, V. 84, p. 3515-3521, 1999.

FERREIRA, F. O. Caquexia do câncer. In: Ikemori EHA, *et al.* **Nutrição em Oncologia**. São Paulo: Tecmedd, p. 419-45, 2003.

FONSECA, E. A. I.; MACIOSZEK, M. A.; SAITO, A. Y.; COTRIM, K. G.; MAZZUCO, T. L. Estudo das alterações morfológicas da glândula adrenal na caquexia neoplásica. "Submetido à publicação **Rev. Semina**", 2008.

FREDELL, E. W.; JOHNSON, H. P.; KRUPP, M. A.; ENGLEMAN, E. P.; MCGRATH, A. K. Adrenocortical function during long-term cortisone therapy. **Arch. Intern. Med.**, V. 95, p. 411, 1955.

GELIN, J.; MOLDAWER, L. L.; LONNROTH, C.; SHERRY, B.; CHIZZONITE, R.; LUNDHOLM, K. Role of endogenous tumor necrosis factor α and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. **Cancer. Res.**, V. 51, p. 415-21, 1991.

GONÇALVES, C. G.; CAMPOS, A. L. C.; COELHO, J. C. U.; SUSUKI, S.; MEGUID, M. M. Malnutrition and cachexia. In: HOFBAUER, K. G., ANKER, S. D.; INUI, A.; NICHOLSON, J. R.(org). **Pharmacotherapy of cachexia**. United States, Taylor & Francis, p. 3-11, 2006.

GUPPY, M.; LEEDMAN, P.; ZU, X.; RUSSEL, V. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. **Biochem. J.**, V. 364, p. 309, 2002.

GUTTRIDGE, D. C.; MAYO, M. W.; MADRID, L. V.; WANG, C. Y.; BALDWIN, A. S. JR. NF-κB-induced loss of MyoD messenger RNA; possible role in muscle decay and cachexia. **Science**, V. 289, p. 2363– 6, 2000.

HENCH, P. S.; KENDALL, E. C.; SLOCUMB, C. H.; POLLEY, H. F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydro-corticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. **Mayo. Clin. Proc.**, V. 24, p. 181-97, 1949.

HERLANT, M.; COLONGE, A.; COURRIER, R. Histological studies on hypophyseal grafts manifesting gonadotropic activity. **C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.**, V. 250, p. 1770-3, 1960.

HERMAN, J. P.; PREWITT, C. M.; CULLINAN, W. E. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. **Crit. Rev. Neurobiol.**, V. 10, p. 371–394, 1996.

IDELMAN, S.; VERDETTI, J. Chapitre 6: Les glandes surrénales. In: **Endocrinologie et Communications Cellulaires**, Grenoble, EDP Sciences. p. 584, 2000.

IMURA, H.; FUKATA, J.; MORI, T. Cytokines and endocrine functions: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. **Clin. Endocrinol.**, V. 35, p. 107-15, 1991.

INGLE, D. J.; KENDALL, E. C. Atrophy of the adrenal cortex of the rat produced by the administration of large amounts of cortin. **Science**, V. 86, p. 245, 1937.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research management. **CA Cancer. J. Clin.**, V. 52, p. 72–91, 2002.

JATOI, A.; LOPRINZI, C. L. Anorexia / weight loss. In: Berger, A.M.; Portenoy, R.K.; Weissmann, D.E. Principles & practice of palliative care & supportive oncology. 2nd ed. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**, p.169-77, 2002.

JATOI, A.; ROWLAND, K.; LOPRINZI, C. L., *et al.* An eicosapentaenoic acid supplement versus megestrol acetate versus both for patients with cancer-associated wasting: a North Central Cancer Treatment Group and National Cancer Institute Canada collaborative effort. **J. Clin. Oncol.**, V. 22, p. 2469-76, 2004.

JOOSTEN, K. F.; KLEIJN, E. D.; WESTERTEP, M.; DE HOOG, M. Endocrine and metabolic responses in children with meningococcal sepsis: striking differences between survivors and nonsurvivors. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, V. 85, p. 3746-53, 2000.

KEITH, B. D. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. **BMC Cancer**, V. 8, p. 84, 2008.

KELBERMAN, D.; DATTANI, M. T.. Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology. **European Journal of Endocrinology**, V. 157, p. 3–14, 2007.

KHISTI, R. T.; S. KUMAR, *et al.* Ethanol rapidly induces steroidogenic acute regulatory protein expression and translocation in rat adrenal gland. **Eur. J. Pharmacol.**, V. 473(2-3), p. 225-7, 2003.

KONTULA, K.; PAAVONEN, T.; LUUKKAINEN, T., *et al.* Binding of progestins to the glucocorticoid receptor. Correlation to their glucocorticoid-like effects on in vitro functions of human mononuclear leukocytes. **Biochem Pharmacol.**, V. 32, p. 1511–8, 1983.

KORPPI, M.; KROGER, L.; LAITNEN, M. White blood cell and differential counts in acute respiratory viral and bacterial infections in children. **Scand J Infect Dis.**, V. 25(4), p. 435-40, 1993.

KRAICER, J.; HERLANT M.; DUCLOS P. Changes in adenohipophyseal cytology and nucleic acid content in the rat 32days after bilateral adrenalectomy and the chronic injection of cortisol. **Canadian Journal of Pshysiology and Pharmacology**, V. 45, p. 947-56, 1967.

KVETNOY, I. M.; REITER, R. J.; KHAVINSON, V. H. Claude Bernard was right: hormones may be produced by "non-endocrine cells. **Neuroendocrinol.**, V. 21, p. 173-174, 2000.

LAMBERTS, S. W. J.; BRUINING, H. A.; DE JONG, F. S. Corticosteroid therapy in severe illness. **N. Engl. J. Med.**, V. 337, p. 1285-1292, 1997.

LEE, J. J. ; EISENBERG, P., *et al.* Reversible changes in adrenocorticotropin (ACTH)-induced adrenocortical steroidogenesis and expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor during the ACTH-insensitive period in young rats. **Endocrinology**, V.145(5), p. 2165-73, 2004.

LEFKOWITZ, R. J.; ROTH, J.; PASTAN, I. ACTH-receptor interaction in the adrenal: a model for the initial step in the action of hormones that stimulate adenyl cyclase. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, V. 185, p. 195-209, 1971.

LIMA, T. M.; LIMA, M. M. R.; ALMEIDA, D. C. G.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R. Cachexia induced by Walker 256 tumor growth causes rat lymphocyte death. **Canc. Immunol. Immunother.**, V. 54, p. 179-86, 2005.

LIU, L.; BOPP, M. M.; ROBERSON, P. K.; SULLIVAN, D. H. Undernutrition and risk of mortality in elderly patients within 1 year of hospital discharge. **J. Gerontol. Med. Sci.**, V. 57, p. 741–6, 2002.

LOBERG, R. D.; BRADLEY, D. A.; TOMLINS, S. A.; CHINNAIYAN, A. M.; PIENTA, K. J. The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. **CA Cancer. J. Clin.**, V. 57, p. 225-241, 2007.

LODHA, R.; VIVEKANANDHAN, S.; SARTHI, M.; ARUN, S. Thyroid function in children with sepsis and septic shock. **Acta Paediatr.**, V. 96, p. 406-9, 2007.

LOPRINZI, C. L.; JENSEN, M. C.; JIANY, N. S., *et al.* Effect of megestrol acetate on the human pituitary-adrenal axis. **Mayo Clin. Proc.**, V. 67, p. 1160–1162, 1992.

LUNDGREN, S.; HELLE, S. I.; LONNING, P. E. Profound suppression of plasma estrogens by megestrol acetate in postmenopausal breast cancer patients. **Clin. Cancer Res.**, V. 2, p. 1515–21, 1996.

MA, K.; MALLIDIS, C.; BHASIN, S.; MAHABADI, V.; ARTAZA, J.; GONZALEZ, C. N.; ARIAS J.; SALEHIAN, B. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, V. 285, p. 363-371, 2003.

MACDONALD N.; EASSON, A. M.; MAZURAK, V. C.; DUNN, G. P.; BARACOS, V. E. Understanding and Managing Cancer Cachexia. **J. Am. Coll. Surg.**, V. 197(1), p. 143-61, 2003.

MACLENNAN, I. C. M. Germinal centers. **Annual Review of Immunology**, V. 12, p. 117-139, 1994.

MANN, M.; KOLLER, E.; MURGO, A., *et al.* Glucocorticoid-like activity of megestrol: a summary of Food and Drug Administration experience and a review of the literature. **Arch. Intern. Med.**, V. 157, p. 1651-6, 1997.

MARNETT, L. J. Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation during prostaglandin biosynthesis. **Life Sci.**, V. 29, p. 531-46, 1981.

MARNETT, L. J. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. **Cancer Res.**, V. 52, p. 5575-89, 1992.

MARTIGNONI, M. E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Câncer cachexia. **Mol. Cancer.**, V. 2(36), p. 1-3, 2003.

MARTÍN, M. S. M.; MARTÍN, M.O. Síndrome de caquexia tumoral. In: Sancho MG. **Medicina Paliativa en la Cultura Latina.**, Madrid: Arán, p. 765-70, 1999.

MATIAS, J. E. F.; CAMPOS, A. C. L. Terapia nutricional no câncer. In: Campos ACL. **Nutrição em Cirurgia.**, São Paulo: Atheneu, p. 281-95, 2002.

MANTOVANI, G.; MACCIO, A.; LAI, P., *et al.* Cytokine activity incancer-related anorexia/cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate. **Semin. Oncol.**, V. 25, p. 45-52, 1998.

MCCARTHY, H. D.; CROWDER, R. E.; DRYDEN, S.; WILLIAMS, G. Megestrol acetate stimulates food and water intake in the rat: effects on regional hypothalamic neuropeptide Y concentrations. **Eur. J. Pharmacol.**, V. 265, p. 99-102, 1994.

MCLVER, B.; GORMAN, C.A. Euthyroid sick syndrome: an overview. **Thyroid.**, V. 7(1), p. 125-32, 1997.

MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. **N. Engl. J. Med.**, V. 335, p. 1897–905, 1996.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, V.329, p. 2002-12, 1993.

MORRISON, S. D. Feeding Response to Change in Absorbable Food Fraction during Growth of Walker 256 Carcinoma. **Cancer Res.**, V. 32, p. 968-972, 1972.

MOURLAN, A. M. S.; LENFANT, M. G.; CHANOINE, C.; GALLIEN, C. L. Pituitary-thyroid axis controls the final differentiation of the dorsal skeletal muscle in urodelan amphibians. **Int. J. Dev. Biol.**, V. 38, p. 99-106, 1994.

NAING, K. K.; DEWAR, J. A.; LEESE, G. P. Megestrol acetate therapy and secondary adrenal suppression. **Cancer**, V. 86, p. 1044–9, 1999.

NAKANO, T.; OHARA, O.; TERAOKA, H.; ARITA, H. Glucocorticoids suppress group II phospholipase A2 production by blocking mRNA synthesis and posttranscriptional expression. **J. Biol. Chem.**, V. 265, p. 12745-8, 1990.

O'BANION, M. K.; WINN, V. D.; YOUNG, D. A. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, V. 89, p 4888-92, 1992.

OKAMOTO, T., FURUYA, M., *et al.* TNF-alpha gene expression in the liver of the IFN-gamma transgenic mouse with chronic active hepatitis. **Biochem Biophys Res Commun.**, V. 226(3), p. 762-8, 1996.

OSBORNE, C. K.; MONACO, M. E.; KAHN, R. C.; HUFF, K.; BRONZERT, D.; MARC, E. L. Direct Inhibition of Growth and Antagonism of Insulin Action by Glucocorticoids in Human Breast Cancer Cells in Culture. **Cancer Research**, V. 39, p. 2422-2428, 1979.

PAEZ-PEREDA, M.; KUCHENBAUER, F.; ARZT, E.; STALLA, G. K. Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, V. 38(10), p. 1487-94, 2005.

PETERS, B. ; CLAUSMEYER, S., *et al.* Specific regulation of StAR expression in the rat adrenal zona glomerulosa. An in situ hybridization study. **J. Histochem. Cytochem.**, V.46(11), p. 1215-21, 1998.

PINHO, N. B.; PACHECO, A. S.; BALUZ, K. B.; OLIVEIRA, A. G. L. **Manual de Nutrição Oncológica: Bases Clínicas**. São Paulo: Atheneu, 2004.

PIZATO, N.; BONATTO, S.; YAMAZAKI, R. K.; AIKAWA, J.; NOGATA, C.; MUND, R. C.; NUNES, E. A.; PICONCELLI, M.; NALIWAICO, K.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutr. Cancer**, Vol. 53(2), p. 194-201, 2005.

POLAK, J. M.; BLOOM, S. R. Immunocytochemistry of the diffuse neuroendocrine system. **Imm.**, p. 328-48, 1986.

POPIELA, T.; LUCCHI, R.; GIONGO, F. Methylprednisolone as palliative therapy for female terminal cancer patients. **Eur. J. Cancer Cli. Oncol.**, V. 25, p. 1823-29, 1989.

RAFF, H. ; HONG, J. J., *et al.* Adrenocortical responses to ACTH in neonatal rats: effect of hypoxia from birth on corticosterone, StAR, and PBR. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, V.284(1), p. 78-85, 2003.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **N. Engl. J. Med.**, V. 329, p. 1246-53, 1993.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids: new mechanisms for old drugs. **N. Engl. J. Med.**, V. 353, p. 1711-1723, 2005.

ROY, R. R.; GARDINER, P. F.; SIMPSON, D. R.; EDGERTON, V. R. Glucocorticoid-induced atrophy in different fibre types of selected rat jaw and hind-limb muscles. **Arch. Oral Biol.**, V. 28, p. 639-643, 1983.

RUSSEL, M. R. D.; SHIKE, M.; MARLISS, E. B., *et al.* Effects of total parenteral nutrition and chemotherapy on the metabolic derangements in small cell lung cancer. **Cancer Res.**, V. 44, p. 1706-11, 1984.

SALZET, M. Immune cells express endocrine markers. **Neuroendocrinol.**, V. 3, p. 8-9, 2002.

SALZMANN, C.; OTIS, M.; LONG, H.; ROBERGE, C.; GALLO-PAYET, N.; WALKER, C. D. Inhibition of Steroidogenic Response to Adrenocorticotropin by Leptin: Implications for the Adrenal Response to Maternal Separation in Neonatal Rats. **Endocrinol.**, V. 145(4), p. 1810-22, 2004.

SAPER, C. B.; LOWEY, A. D.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. Direct hypothalamoautonomic connections. **Brain Res.**, V. 117, p. 305-12, 1976.

SAVARY, I.; DEBRAS, E.; DARDEVET, D.; SORNET, C.; CAPITAN, P.; PRUGNAUD, J.; MIRAND, P. P.; GRIZARD, J. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. **Br J Nutr.**, V. 79, p. 297-304, 1998.

SCHAUR, R. J.; FELLIER, H.; GLEISPACH, H., *et al.* Tumor host relations I. Increased plasma cortisol in tumor-bearing humans compared with patients with benign surgical diseases. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** V. 93, p. 281-5, 1979.

SEENE, T. Turnover of skeletal muscle contractile proteins in glucocorticoid myopathy. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.**, V. 50, p. 1-4, 1994.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, V. 138, p. 32, 1936.

SHAW, R. J. Glucose metabolism and cancer. **Curr. Opin. Cell Biol.**, V. 18, p. 598-608, 2006.

SMITH, S. R.; BLEDSOE, T.; CHETRI, M. K. Cortisol metabolism and the pituitary-adrenal axis in adults with protein-calorie malnutrition. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, V. 40, p. 43-52, 1975.

SMYTH, C. J.; BLACK, R. L.; DEMARTINI, F. E.; DUFF, F.; ENGLEMAN, E. P.; GRAHAM, D. C.; MONTGOMERY, M. M.; POLLEY, H. F.; ROSENBERG, E. F.; SACASA, C. F.; STEINBROCKER, W. H.; WILSON, G. M.. **Ann. Intern. Med.**, V. 53(7), p. 68, 1960.

STEWART, P. M. Chapter 14: The Adrenal Cortex. In: LARSEN, P. R., Kronenberg, H. M., Melmed, S., Polonsky, K. S. **Williams Textbook of Endocrinology**, 10th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p. 491-551, 2003.

STUMPF, W. E. Localization of hormones by autoradiography and other Histochemical techniques. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, V.1(18), 1980.

SVANINGER, G.; GELIN, J.; LUNDHOLM, K. Tumor host wasting not explained by adrenal hyperfunction in tumor-bearing animals. **J. Natl. Cancer Inst.**, V. 79, p. 1135-41, 1987.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J. Clin. Invest.**, V. 107, p. 7-11, 2001.

TIETZ, N. W. **Clinical Guide to Laboratory Tests**. 4th ed. Saunders, 1995.

TISDALE, M. J. Cachexia in cancer patients. **Nature Reviews**, V. 2, p. 861-871, 2002.

TROUILLAS, J.; LAURENT, D., *et al.* Polysialylated neural cell adhesion molecules expressed in human pituitary tumors and related to extrasellar invasion. **J. Neurosurg.**, V. 98, p. 1084-93, 2003.

ULRICH-LAI, Y. M.; FIQUEIREDO, H. F.; OSTRANDER, M. M.; CHOI, D. C.; ENGELAND, W. C.; HERMAN, J. P. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **Am. J. Physiol. Endocrinol.**, V. 291, p. 965-73, 2006.

VAN HALTEREN, H. K.; BONGAERTS, G. P. A.; WAGENER, D. J. T. H. Cancer cachexia: what is known about its etiology and what should be the current treatment approach? **Anticancer Res.**, V. 23(6), p. 5111-6, 2003.

VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. **Liver.**, V. 22, p. 342-50, 2002.

WAITZBERG, D. L.; ALVES, C. C.; TORRINHAS, R. S. M. M. Incidência da desnutrição em câncer. In: Waitzberg DL. **Dieta, nutrição e câncer**, São Paulo: Atheneu, p. 269-76, 2004.

WALKER, M. J.; LIM, C. L.; BEATTIE, C. W.; DAS GUPTA, T. K. Glucocorticoid receptors (GR) in soft tissue sarcomas. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, V. 27, p. 891, 1986.

ZALOGA, G. P. Sepsis-induced adrenal deficiency syndrome. **Crit. Care Med.**, V. 29(3), p. 688-690, 2001.

ZEPP, E. A.; GRAY, M. V. Hormones of the pituitary-adrenal axis in rats bearing the Walker 256 carcinoma. **Cancer Lett.**, V. 18(2), p. 149-55, 1983.

ZHAO, H. F. ; LABRIE, C., *et al.* Characterization of rat 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase cDNAs and differential tissue-specific expression of the corresponding mRNAs in steroidogenic and peripheral tissues. **J. Biol. Chem.**, V.266(1), p. 583-93, 1991.

ZITNIK, R. J.; WHITING, N. L.; ELIAS, J. A. Glucocorticoid inhibition of interleukin-1-induced interleukin-6 production by human lung fibroblasts: evidence for transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, V.10, p. 643-50, 1994.