



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JEFFERSON CRESPICIO

**MODULAÇÃO DO EIXO CORTICOTRÓFICO NA
CAQUEXIA NEOPLÁSICA EM UM MODELO ANIMAL**

Londrina
2013

JEFFERSON CRESPIGIO

**MODULAÇÃO DO EIXO CORTICOTRÓFICO NA
CAQUEXIA NEOPLÁSICA EM UM MODELO ANIMAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito final à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa Dra Tânia Longo Mazzuco

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C921m Crespigio, Jefferson.
Modulação do eixo corticotrófico na caquexia neoplásica em um modelo animal / Jefferson Crespigio. – Londrina, 2013.
54 f. : il.

Orientador: Tânia Longo Mazzuco.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Câncer – Modelos animais – Teses. 2. Caquexia – Teses. 3. Glândulas supra-renais – Teses. 4. Glândula pituitária – Teses. 5. Glicocorticóides – Teses. I. Mazzuco, Tânia Longo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616-006.6

JEFFERSON CRESPIGIO

**MODULAÇÃO DO EIXO CORTICOTRÓFICO NA CAQUEXIA
NEOPLÁSICA EM UM MODELO ANIMAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito final à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Daniel Fernandes
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

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

Profa. Dra. Estêfania Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Londrina, 13 de junho de 2013

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Tânia Longo Mazzuco, pela orientação mais que integral e pelo exemplo de conduta ética e cuidadosa em cada detalhe do meu trabalho.

À banca examinadora, Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho, Prof. Dr. Daniel Fernandes e Profa Dra Tânia Longo Mazzuco pelas valiosas sugestões e contribuições ao trabalho.

À Profa. Dra. Helenir Medri de Souza pelo importante apoio e contribuição com a parte técnica na inoculação e acompanhamento dos animais com tumor de Walker.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Da Saúde, pela imensa contribuição para a minha formação científica.

Aos técnicos, Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho do Laboratório de Patologia do CCB e Maria Claudia de Souza, Adriana Serva Lino e Marcos Aurélio R. de Souza do Laboratório Logos, pela contribuição técnica durante este trabalho.

Aos colegas de mestrado e do grupo de estudos dos tumores da adrenal, em especial a Luciane Lazari Berbel e Emerson Sampaio pela amizade e companheirismo durante todo o programa de mestrado.

Às suplentes do meu trabalho, Profa. Dra. Helenir Medri de Souza e Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira.

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

À Sandra Lage (Secretaria da pós-graduação em Ciências da Saúde) pelo auxílio nas questões burocráticas durante todo o mestrado.

CRESPIGIO, Jefferson. **Modulação do eixo corticotrófico na caquexia neoplásica em um modelo animal**. 2013. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2013.

RESUMO

A síndrome da anorexia-caquexia (SAC) é uma importante condição clínica no câncer em estágio avançado, estando relacionada à importante diminuição de sobrevida nos pacientes. A presença do tumor e sua interação com o hospedeiro desencadeiam a liberação de várias substâncias como interleucinas, caracterizando um estado de estresse, com consequente ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da caquexia neoplásica sobre o eixo HPA através do estudo morfofuncional das glândulas adrenais e hipófise. Para indução do tumor de Walker-256, células tumorais (LLC WRC-256) foram inoculadas subcutaneamente em ratos machos Wistar. Animais do grupo controle foram inoculados apenas com o veículo. A aferição da massa tumoral foi feita a partir do 4º dia e os animais foram sacrificados no 5º e no 12º dias do experimento, correspondendo a importantes alterações metabólicas da SAC neste modelo experimental. No dia do sacrifício foi avaliada a perda de massa corpórea, foram dissecados e pesados o tumor, a adrenal e hipófise para estudo morfológico e estudo imunohistoquímico do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) hipofisário e da enzima 3 β HSD (3-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase) no córtex da adrenal. Os animais portadores de tumor apresentaram redução do peso a partir do 5º dia (2,5 % em relação ao controle, $p < 0,05$) e desenvolvimento de caquexia, confirmando a presença de SAC. Além disso, a presença do tumor causou resposta inicial de aumento dos pesos absolutos e relativos da adrenal e da hipófise no 5º dia ($p < 0,01$), com redução dos mesmos no 12º dia associado à hiperplasia glandular em um momento inicial da evolução tumoral, com regressão subsequente dos parâmetros morfológicos. Houve correlação moderada entre os aumentos dos pesos relativos da adrenal e da hipófise. Os resultados demonstraram diminuição da imunoexpressão da enzima 3 β HSD no córtex da adrenal ($p < 0,01$) em ratos portadores de tumor, e diminuição da secreção de corticosterona plasmática após o teste funcional com ACTH, confirmando a exaustão adrenal. Houve aumento da imunoexpressão do ACTH na região da adeno-hipófise no 5º dia seguido de queda no 12º dia nos animais com tumor ($p = 0,05$). Com isso, observamos que a avaliação morfológica macro e microscópica não pode ser utilizada como parâmetro único na avaliação da resposta do eixo HPA modulada pela presença do tumor ao longo do tempo. Esses resultados sugerem uma dupla resposta do eixo corticotrófico à presença do tumor, uma resposta precoce com ativação do eixo seguida de falência adrenal primária, caracterizada por diminuição da secreção de glicocorticóides apesar do aumento da síntese de ACTH. Esta é uma demonstração da influência deletéria da SAC sobre a glândula adrenal, com hiperativação do eixo HPA. Deste modo, a resposta adaptativa ao câncer provoca alterações morfológicas nas glândulas adrenais e hipófise e interfere no funcionamento do eixo HPA. A compreensão deste processo fornece embasamento para futuros estudos em oncologia clínica.

Palavras-chave: Caquexia. Câncer. Carcinoma 256 de Walker. Sistema hipófise-supra-renal. Glândulas supra-renais. Glândula hipófise. Glicocorticóides.

CRESPIGIO, Jefferson. **Modulation of the corticotrophic axis in neoplastic cachexia in an animal model.** 2013. 54 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, PR 2013.

ABSTRACT

The anorexia-cachexia syndrome (ACS) is an important clinical condition that arises in patients with advanced cancer being related to a significant decrease in their survival. The presence of the tumor and its interaction with the host triggers the release of numerous substances like interleukins, characterizing a state of stress with consequent activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). The objective of this study was to evaluate the influence of neoplastic cachexia on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with a morphofunctional study of the adrenal and pituitary gland. For Walker-256 tumor induction, neoplastic cells (LLC WRC-256) were subcutaneously inoculated in Wistar male rats. The animals on control group were inoculated with PBS. The tumor mass was measured starting in the 4th day, and the animals were sacrificed on the 5th and 12th days of the experiment, corresponding to important periods of metabolic alterations during the development of the CAS. On the day of sacrifice we evaluated the loss of body mass, the tumor, the pituitary and the adrenals were dissected and weighed for morphologic and immunohistochemical study of the ACTH (adrenocorticotrophic hormone) in the pituitary and the 3β HSD enzyme (3-beta-hydroxysteroid-dehydrogenase) in the adrenal cortex. The tumor-bearing rats showed a reduction in weight from day 5 (2.5 % versus control, $p < 0.05$) and the development of cachexia, confirming the presence of CAS. Moreover, the tumor presence caused increase in the absolute and relative adrenal and pituitary weights on the 5th day ($p < 0.01$), with subsequent regression on the 12th day, associated with glandular hyperplasia at a first moment with a posterior regression of the morphologic parameters. There was a moderate correlation between the increase of the adrenal and pituitary weight. The 3β HSD enzyme immunoreactivity was decreased in the adrenal cortex ($p < 0.01$) and the functional test with ACTH demonstrated decreased secretion of corticosterone in tumor-bearing rats, confirming adrenal exhaustion. There was an increase in the ACTH immunoreactivity on day 5 in the anterior lobe of the pituitary with subsequent decrease, ($p = 0.05$). According to this, we conclude that the macroscopy and microscope evaluation cannot be taken as a single parameter for the evaluation of the HPA axis modulated for the tumor presence. These results suggest a biphasic response of the corticotrophic axis during the development of CAS, an early response with axis activation and a subsequent response with adrenal exhaustion and reduction in the secretion of glucocorticoids, demonstrating the deleterious influence of CAS on the HPA axis. Thus, the adaptive response to cancer causes morphological changes in the pituitary and adrenal glands and interferes with the correct functioning of the HPA axis. Understanding this process can provide us information for future studies in clinical oncology.

Keywords: Cachexia. Cancer. Walker 256 Carcinoma. Pituitary-adrenal-system. Adrenal glands. Pituitary gland. Glucocorticoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tumor de Walker.....	10
Figura 2 – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal	13
Figura 3 – Fotomicrografias da glândula hipófise	14
Figura 4 – Fotomicrografia da glândula adrenal em ratos	17
Figura 5 – Biossíntese dos esteróides na glândula adrenal de ratos.....	18

ARTIGO

Figure 1. Glucocorticoid function of the adrenal cortex	41
Figure 2. Time course of change in body weight.....	42
Figure 3. Tumor and cachexia measurements.....	43
Figure 4. Adrenal morphometrical parameters	44
Figure 5. Pituitary morphometrical parameters	45
Figure 6. Comparison between tumor, pituitary and adrenal weights	46
Figure 7. Tissue expression of 3BHSD.....	47
Figure 8. Tissue expression of ACTH	48
Supplementary figure 1. Representative images of adrenal cortex.....	49
Supplementary figure 2. Representative images of immunohistochemical staining of the 3BHSD	50
Supplementary figure 3. Representative image of immunohistochemical staining of the ACTH.....	51

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico.
AgRP	Peptídeo relacionado ao agouti
AVP	Arginina vasopressina
CART	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CRH-1,2	Receptor do hormônio liberador de corticotrofina do tipo 1, 2.
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.
LPH	Lipotropina
MCR1,2,3,4 e 5	Receptores de melanocortina do tipo 1, 2 3, 4 e 5.
MSH	Melanotropina
NPY	Neuropeptídeo Y
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
SAC	Síndrome da anorexia caquexia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
	1.1 <i>Síndrome da anorexia caquexia no câncer</i>	9
	1.2 <i>Controle da ingestão alimentar</i>	11
	1.3 <i>O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal</i>	12
	1.4 <i>Glândula hipófise</i>	14
	1.5 <i>Glândula adrenal e esteroidogenese</i>	16
	1.6 <i>Respostas ao estresse</i>	20
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS GERAIS	21
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5	MATERIAL E MÉTODOS	22
	5.1 <i>Animais</i>	22
	5.2 <i>As células tumorais de Walker-256</i>	22
	5.3 <i>Implantação das células tumorais e cálculo do volume tumoral</i>	23
	5.4 <i>Teste funcional da glândula adrenal</i>	23
	5.5 <i>Dosagem da corticosterona plasmática</i>	23
	5.6 <i>Sacrifício dos animais e coleta dos órgãos</i>	24
	5.7 <i>Determinação do índice de caquexia</i>	24
	5.8 <i>Processamento histopatológico e reação de imuno-histoquímica</i>	25
	5.9 <i>Interpretação das lâminas e morfometria computadorizada</i>	26
	5.10 <i>Análise estatística</i>	26
6	RESULTADOS	27
7	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome da anorexia caquexia no câncer

O câncer é um importante problema de saúde pública atualmente, sendo a segunda causa de morte por doença no Brasil, depois das doenças cardiovasculares, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer, órgão do ministério da saúde (2012) (INCA, 2011). Dentre as diversas consequências causadas pelo câncer aos pacientes, podemos encontrar a anorexia e a caquexia, em estágio avançado da doença, o que contribui de maneira intensa na piora da sobrevida e na mortalidade nesses pacientes.

A palavra caquexia possui origem grega e significa *caques*: mal e *xia*: condição, caracterizada pela profunda perda de tecido adiposo e músculo esquelético levando eventualmente a hipoalbuminemia e astenia e quando associada à anorexia, caracterizada pela perda do apetite, surge uma condição debilitante denominada síndrome da anorexia caquexia (SAC) (Laviano et al, 2005). A síndrome ocorre em mais de 50 % dos pacientes com câncer, atingindo até 80% dos pacientes em estágio terminal, sendo a principal causa de perda de peso e aumento da mortalidade nesses pacientes (Fujitsuka et al, 2011).

Em humanos, o diagnóstico da síndrome é realizado através de parâmetros clínicos, laboratoriais e do peso corpóreo dos pacientes. A suspeita clínica surge quando a perda de peso é maior do que 5 % em 6 meses (Inui, 2002). Um dos principais fatores relacionados à gravidade do quadro com importantes implicações no tratamento dos pacientes, é que a diminuição da ingestão alimentar não explica a extensa perda de massa muscular que ocorre nesses pacientes, ocorrendo inclusive com ingestão alimentar normal (Elamin, 2011). Conseqüentemente, o suporte nutricional “per se” não reverte as importantes alterações metabólicas encontradas, como o aumento no catabolismo, a diminuição da síntese protéica, o aumento da produção de proteínas de fase aguda no fígado e a redução do tecido adiposo, através da lipólise.

Em animais, o diagnóstico da SAC se dá quando há perda de massa corpórea maior ou igual a 10% e diversos modelos experimentais existem como por exemplo, o Tumor de Walker-256. Esse modelo experimental surgiu a partir de células isoladas de um carcinoma de surgimento espontâneo na glândula mamária de ratas albinas prenhas, desenvolvidas pelo professor George Walker em 1928 (Figura 1). Desde então, essas células vem sendo mantidas

em laboratório, na sua forma indiferenciada de carcinossarcoma altamente agressivo o que tem sido um importante recurso na oncologia experimental, devido a capacidade de induzir rapidamente um estado de caquexia neoplásica (Corbello Pereira et al, 2004).

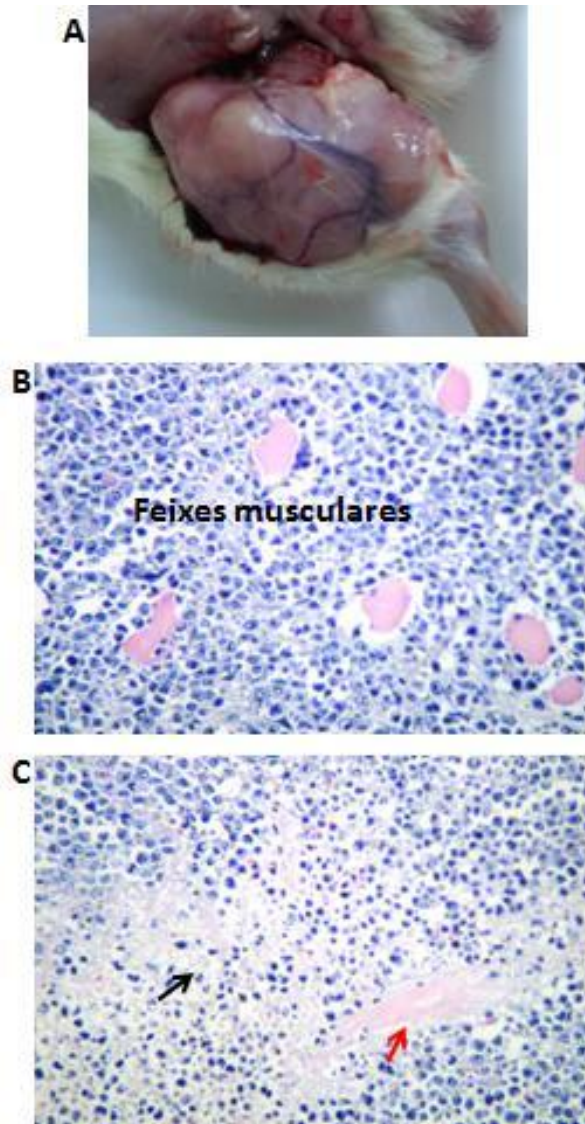


Figura 1- Tumor de Walker. A. Imagem macroscópica de um rato com tumor de Walker após 12 dias de evolução tumoral. Após dissecado, o tumor apresenta aspecto bocelado com coloração esbranquiçada e vasos congestionados; B. Fotomicrografia evidenciando células pleomórficas, com intensas atipias (aumento 10x); C. Fotomicrografia demonstrando a presença de necrose (seta negra) e áreas de invasão e destruição da fibras musculares (seta vermelha), ambas características típicas de neoplasias malignas com comportamento agressivo (aumento 10x).

1.2. Controle da ingestão alimentar

Em condições normais, o controle da ingestão alimentar ocorre primariamente no hipotálamo, através de um grupo específico de neurônios, que integram as informações do sangue periférico, status do tecido adiposo e informações metabólicas (Laviano et al, 2008).

Dentro do hipotálamo, o núcleo arqueado em roedores é considerado importante sensor das alterações periféricas através de duas populações distintas de neurônios. A primeira população de neurônios expressa pró-opiomelanocortina (POMC), em roedores a grande maioria das células também expressa o peptídeo anorético CART. O POMC é um precursor polipeptídeo inerte, que é clivado em peptídeos menores, biologicamente ativos, entre eles as melanocortinas e o ACTH. As melanocortinas exercem seu efeito através da ligação com um família de receptores, do tipo de receptores acoplados a proteína G. O receptor do tipo 4 (MCR4), é um componente importante, mediando uma resposta anorética e catabólica (Cone, 2005).

O segundo grupo de neurônios expressam o potente peptídeo orexigênico denominado neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgRP). Inclusive a AgRP é um antagonista endógeno do MCR4.

De acordo com as informações do status metabólico que chegam ao cérebro, uma população ou outra de neurônios é ativada. Quando há um déficit de energia, os neurônios prófágicos, do grupo NPY/AgRP são ativados, levando a um aumento da ingestão alimentar enquanto os neurônios anorexigênicos do grupo POMC/CART são inibidos. Na presença de excesso de energia, os neurônios POMC/CART são ativados, levando a uma liberação de melanocortinas nos terminais axônicos, e através do receptor MCR4, suprimem a ingestão alimentar.

Na síndrome da anorexia-caquexia associada ao câncer, o hipotálamo responde de maneira inapropriada aos sinais do status metabólico periférico, de modo que os neurônios anorexígenos do grupo POMC/CART estão constantemente ativados.

1.3. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

A manutenção da vida depende da capacidade dos organismos manterem constante seu equilíbrio interno. Qualquer distúrbio causado à essa homeostasia ativa o “sistema do stress”, o qual integra os mecanismos de defesa contra os agentes agressores (Pignatelli et al, 2000). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e o sistema simpático adreno-medular são os principais sistemas responsáveis pela manutenção da homeostasia, sendo a glândula adrenal um órgão essencial e comum a ambos os sistemas (Ulrich-Lai et al, 2006)

Neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) secretam hormônios liberadores como o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina (AVP), na circulação portal da eminência mediana. Esses agem de maneira sinérgica na hipófise anterior, promovendo a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sistêmica. O ACTH age no córtex da glândula adrenal, mais especificamente na camada fasciculada estimulando a síntese e a secreção de hormônios glicocorticóides (cortisol, no humano e corticosterona no rato). A ativação do sistema nervoso simpático em condições de stress, leva a ativação das células cromafins da camada medular da adrenal, liberando assim catecolaminas e neuropeptídeos na circulação sistêmica. Os hormônios glicocorticóides e as catecolaminas possuem ações complementares em importantes funções vitais como na mobilização de energia e na manutenção da pressão sanguínea (Smart et al, 2007).

Os glicocorticóides exercem retrocontrole negativo inibindo a secreção hipotalâmica de CRH e agem diretamente nos corticotrófos da hipófise anterior inibindo a transcrição do gene da pro-ópiomelanocortina (POMC), molécula precursora do ACTH, bem como a secreção basal e estimulada do mesmo (Figura 2) (Chrousos & Kino, 2007).

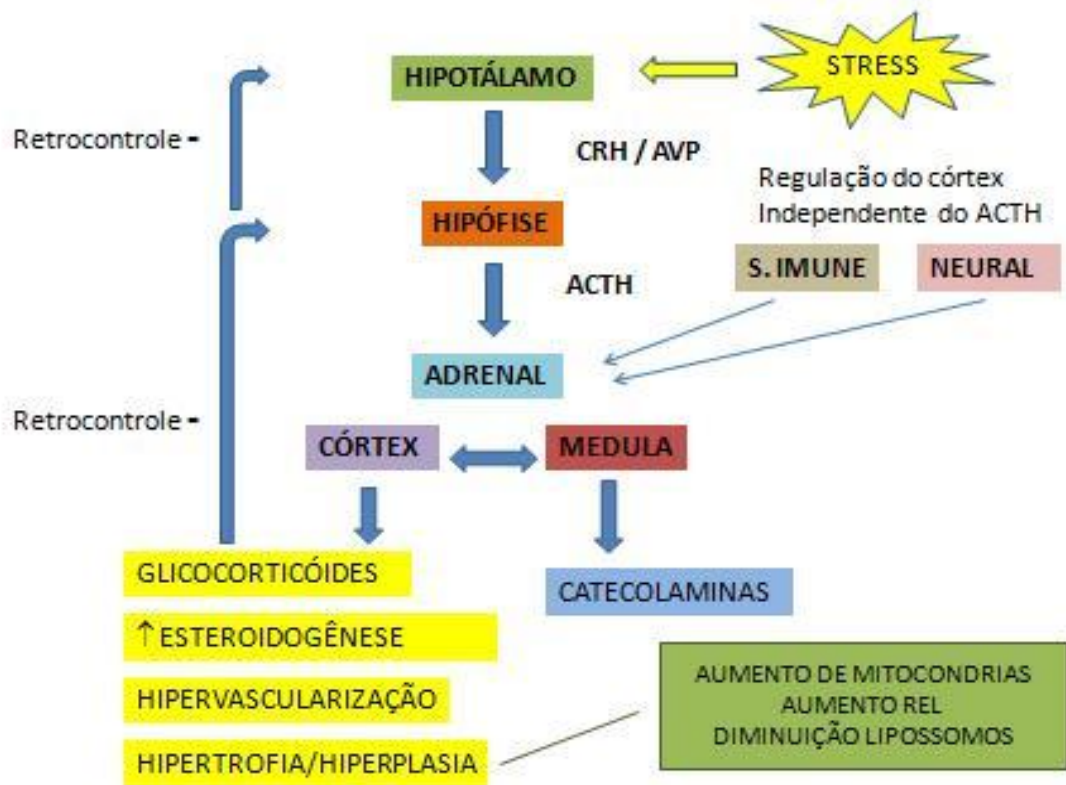


Figura 2- Eixo hipotálamo – hipófise – adrenal. Dentro do hipotálamo, no núcleo paraventricular, neurônios hipofisotróficos liberam CRH na eminência mediana, o qual atinge as células hipofisárias através do sistema venoso porta. O CRH ativa os receptores do tipo 1 (CRH-1), localizados nos corticotrófos da adeno-hipófise e nos melanotrófos da zona intermediária, induzindo a expressão do gene da POMC e consequente secreção hormonal. Após a ativação do eixo em situações de estresse agudo ou crônico, a liberação do ACTH, pela adeno-hipófise, desencadeia uma série de alterações fisiológicas, morfológicas e moleculares no córtex da glândula adrenal. A secreção final de glicocorticóides pelo córtex da adrenal além de estar sob controle dos hormônios hipofisários, recebe influência de estímulos do sistema imune e neural além da camada medular da adrenal.

1.4. Glândula hipófise

A hipófise é um pequeno órgão pesando cerca de 1 g no homem adulto e cerca de 6 mg no rato. Ela localiza-se na sela túrcica do osso esfenóide e liga-se ao hipotálamo, por um pedículo, com o qual guarda importantes relações anatômicas e funcionais. Ela tem origem embrionária dupla, a porção de origem nervosa é denominada neuro-hipófise, a qual é constituída por células gliais modificadas e axônios de neurônios, cujos corpos localizam-se no hipotálamo. Sua principal função fisiológica é armazenar e liberar os hormônios hipotalâmicos, ocitocina e vasopressina. A porção originada do ectoderma é denominada adeno-hipófise (Figura 3).

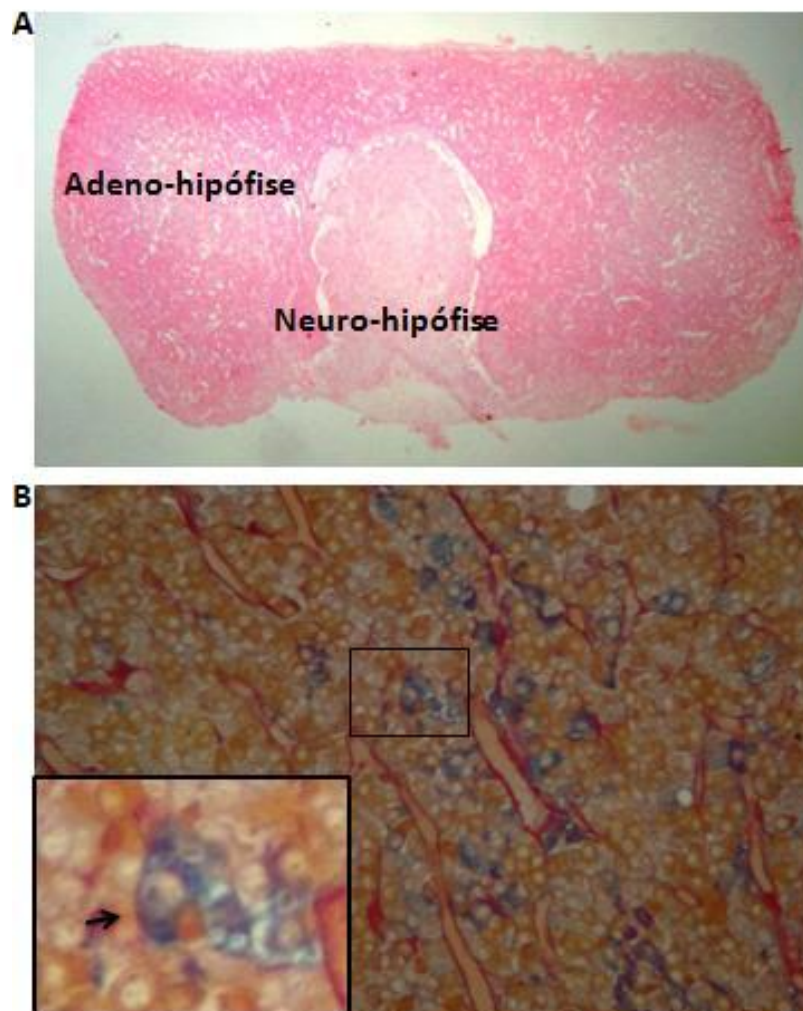


Figura 3- Fotomicrografias da glândula hipófise. A. Visão panorâmica da glândula (aumento 4x), coloração de hematoxilina-eosina (HE); B. Coloração de alcian blue-PAS-orange G (aumento de 40x com zoom de 3x), evidenciando as células basófilas da adenohipófise (seta).

A adeno-hipófise, possui três regiões distintas, a *pars distalis*, a *pars intermedia* e a *pars tuberalis*. O lobo anterior é o principal local de produção de hormônios na hipófise e as células que antigamente eram identificadas de acordo com a afinidade tintorial em basófilas, acidófilas e cromóforas, com o advento das técnicas de imuno-histoquímica puderam ser classificadas de acordo com o hormônio contido em seus grânulos de secreção. Encontramos cinco tipos de células altamente especializadas na adeno-hipófise, entremeadas por uma rica rede de sinusóides. São as somatotróficas, responsáveis pela secreção da somatotrofina, as mamotróficas que secretam a prolactina, as gonadotróficas responsáveis pela secreção dos hormônios folículo estimulante e do hormônio luteinizante e as tireotróficas e corticotróficas responsáveis pela secreção do hormônio tireotrófico e adrenocorticotrófico respectivamente (Yeung et al, 2006).

As células corticotróficas são células basófilas, poligonais, com núcleos esféricos e periféricos (Figura 3B), elas produzem pro-opiomelanocortina (POMC) e seus derivados incluindo adrenocorticotropina (ACTH), melanotropina (MSH) e lipotropina (LPH). Elas representam aproximadamente 15 a 20% das células da adeno-hipófise e se localizam principalmente na região central da glândula. Além disso, as células corticotróficas são o principal componente do lobo intermediário, pouco desenvolvido em humanos, mas importante fonte de melanotropina nos ratos e em outros mamíferos (Olah et al, 2009).

1.5. Glândula adrenal e esteroidogenese

A glândula adrenal é o órgão endócrino mais comumente relacionado às situações de estresse. Ela é constituída por duas partes funcionais distintas, a zona externa, ou córtex, representando 80 a 90% da glândula e a zona interna, ou medula. Estão localizadas no retroperitônio, sobre o pólo superior de ambos os rins pesando no homem de 6 a 10 g e no rato 25 mg.

O córtex da adrenal é composto por três zonas distintas (Figura 5), a camada mais externa de células denominada zona glomerulosa ou *multiformis*, devido ao arranjo das células num padrão arqueado é a responsável pela síntese de aldosterona, hormônio que regula a reabsorção de sódio e a excreção de potássio através dos rins, controlando assim o volume do fluido extracelular. A zona fasciculada, a mais espessa do córtex, é constituída por cordões de células, com citoplasma amplo e vacuolado, devido a presença de gotículas de lipídios, sendo a responsável pela síntese de glicocorticóides, o cortisol no homem e a corticosterona nos murinos. A zona reticular, também constituída por células amplas, dispostas em um arranjo arredondado, secreta glicocorticóides e em algumas espécies, pequena quantidade de hormônios esteróides.

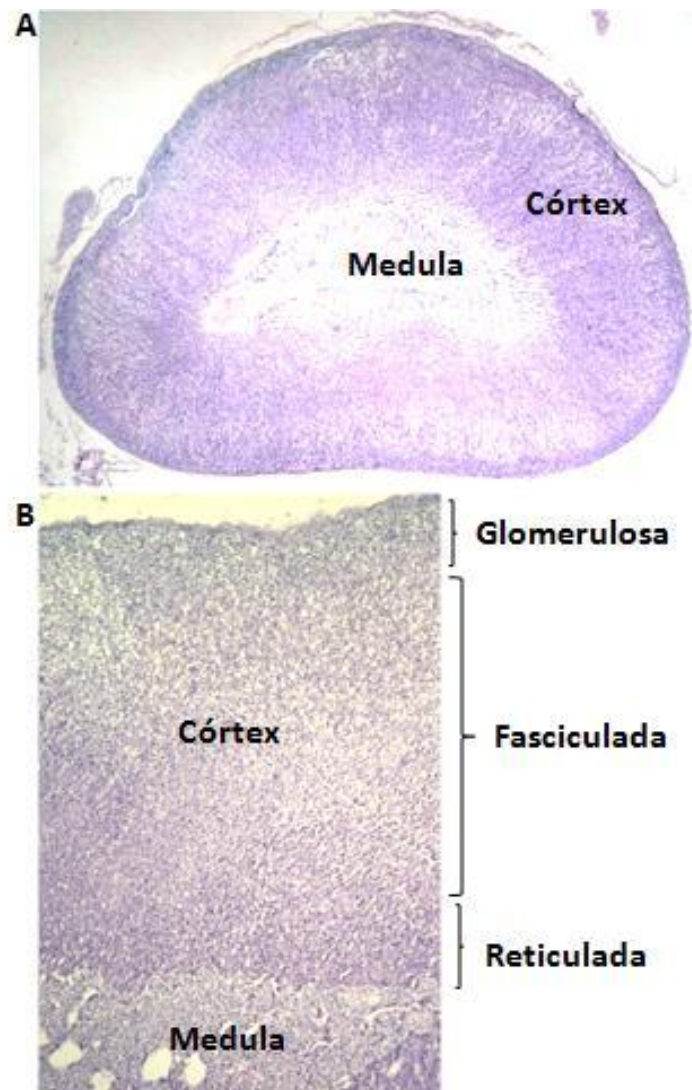


Figura 4- Fotomicrografia da glândula adrenal em ratos. A. Fotomicrografia da glândula adrenal em menor aumento (4X), evidenciando a camada cortical e a camada medular; B. Fotomicrografia representativa da camada cortical demonstrando as três unidades morfofuncionais (aumento 10X), ambas as imagens com coloração pelo método de HE.

O precursor dos hormônios adrenocorticais é o colesterol, esse pode ser sintetizado na adrenal, em pequena quantidade, a partir da acetil coenzima A, ou pode ser absorvido, via receptores de membrana na forma de lipoproteína de baixa densidade (LDL) ou de alta densidade (HDL) (Figura 6). No rato somente a forma HDL é captada. O colesterol é armazenado na forma de acetato de colesterol, constituindo um pool imediato para a síntese de glicocorticóides.

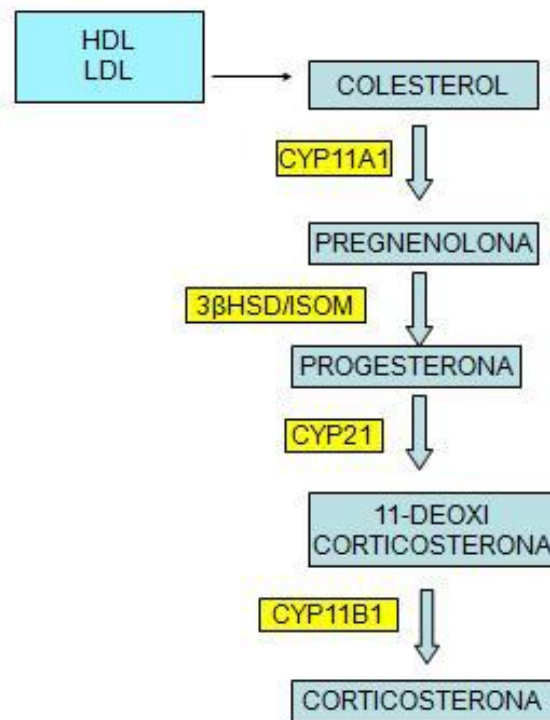


Figura 5- Biossíntese dos esteróides na glândula adrenal de ratos. HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; CYP11A1, 20 α ,22R hidroxilase de clivagem da cadeia lateral do colesterol; 3 β HSD/ISOM, 3 β -hidroxiesteróidesdesidrogenaseisomerase; CYP21, 21-hidroxilase; CYP11B1, 11 β -hidroxilase.

O primeiro hormônio esteróide produzido a partir do colesterol é a pregnenolona, com a ação da enzima mitocondrial citocromo P-450 CYP11A1. Esta reação é extremamente importante visto que é uma etapa limitante na síntese dos hormônios esteróides. Está sobre controle da ação do ACTH, produzido pela glândula hipófise. O ACTH, liga-se a receptores de membrana acoplados a proteína G, das células da camada fasciculada, aumentando assim a

concentração do cAMP citoplasmático e a disponibilidade do colesterol para a enzima CYP11A1. A proteína StAR(steroidogenicacute regulatoryprotein) é essencial para o transporte do colesterol (proveniente do citosol) do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial. Após a síntese da pregnenolona, a síntese dos glicocorticóides continua na mitocôndria e no retículo endoplasmático liso, onde outras enzimas atuarão, para formar a corticosterona(Rosol et al, 2001).

A enzima 3 β HSDparticipa de uma etapa essencial na síntese de glicocorticóides, ela catalisa a transformação da pregnenolona em progesterona. Apesar dos roedores conterem múltiplas isoformas da 3 β HSD com atividade enzimática e expressão tecidual diferentes, o genoma humano apresenta somente dois genes ativos. Assim, a 3 β HSD I é uma desidrogenase/isomerase expressa na placenta, mama, fígado, cérebro e em alguns outros tecidos e a 3 β HSD II é expressa nas gônadas e na adrenal (Miller & Auchus, 2011). O repertório de enzimas expresso em uma célula esteroideogênica reflete a capacidade de síntese da célula. Conseqüentemente, a determinação da imunoexpressão da tais enzimas nos dá informação da capacidade secretora da glândula.

1.6. Respostas ao estresse

Qualquer agressão a organismos vivos induz uma resposta aguda, a qual é essencial para a sobrevivência. Os níveis plasmáticos de ACTH, catecolaminas e glicocorticoides têm sido utilizados para caracterizar uma resposta ao stress estando os mesmos elevados, particularmente na fase aguda do processo. Em estados crônicos, os níveis de glicocorticoides mantêm-se elevado, enquanto os de ACTH apresentam-se normais ou diminuídos (Pignatelli et al, 2000).

Em estados crônicos, a elevação dos níveis de glicocorticoides, apesar da diminuição dos níveis do ACTH, tem sido atribuída ao aumento das enzimas na zona fasciculada da adrenal. O aumento dos receptores do ACTH, bem como a diminuição do clearance da corticosterona são outros possíveis mecanismos relacionados a resposta ao stress crônico (Pignatelli et al, 1998).

Alguns estudos demonstram que apesar da existência de um quadro de estresse, como em pacientes com choque séptico, pacientes com neoplasias em estado avançada ou com AIDS, o eixo HHA encontra-se em um estado hiporresponsivo, com a baixa secreção de corticosteróides. Dentre os possíveis mecanismos podemos citar a presença de substâncias que interferem com o funcionamento correto da glândula adrenal, com a ação do ACTH ou até mesmo com a hipófise e o hipotálamo (Annane et al, 2006). A insuficiência adrenal é definida como sendo primária quando é decorrente de alterações na própria glândula adrenal ou secundária quando surge por alterações na hipófise ou no hipotálamo (Prigent et al, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, órgão do ministério da Saúde, as neoplasias malignas atualmente são a 2ª causa de morte por doença no Brasil. As últimas estimativas apontam aproximadamente 490 mil casos novos de câncer ao ano. A caquexia está presente em 50 % dos casos de câncer, se consideradas as diversas neoplasias malignas em conjunto; assim sendo a caquexia neoplásica é uma condição bastante frequente. Enquanto que a presença do câncer representa, em si, um agente estressor ao organismo, a instalação da caquexia intensifica ainda mais a resposta do estresse. O comportamento do eixo HHA não é totalmente conhecido, na vigência da caquexia. O modelo animal é o mais adequado para a realização de experimentos *in vivo* na tentativa de compreender esse processo. Por isso, o modelo de caquexia em ratos, induzida pelo tumor de Walker-256 é uma ferramenta experimental importante visto que seu comportamento biológico agressivo desencadeia o quadro de caquexia em um curto período de tempo. As alterações metabólicas na caquexia neoplásica tem sido objeto de estudo em nosso grupo de pesquisas, onde a presença de alterações nas glândulas adrenais sugere a participação do eixo corticotrófico na modulação da caquexia culminando com a resposta insuficiente ao teste de função adrenal (Fonseca et al, 2009; Sripes et al, 2009). Porém, tanto a sua fisiopatologia ao longo do curso do desenvolvimento tumoral quanto a etiologia da hiporresponsividade adrenal ainda não estão elucidadas.

3. OBJETIVOS GERAIS

Compreender o comportamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal baseado em alterações morfológicas e no teste funcional, através de um modelo animal de caquexia neoplásica.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar as alterações morfológicas das glândulas hipófise e adrenal em ratos portadores de tumor sólido de Walker-256, no momento da instalação da anorexia e após a progressão tumoral com a caquexia.

Realizar uma análise morfo-funcional da glândula hipófise e da adrenal, caracterizando a atividade hormonal das células corticotróficas hipofisárias e das células responsáveis pela síntese de corticosterona no córtex da adrenal, nos diferentes estágios da síndrome da anorexia-caquexia causada pelo câncer, comparativamente à glândula de animais sem tumor.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 38 ratos Wistar, machos, pesando entre 200 e 250 g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com cepilho. Permaneceram em ambiente com temperatura controlada, sob ciclo de claro/escuro de 12h, sendo alimentados *ad libitum* com água e dieta padrão (ração).

5.2. As células tumorais de Walker-256

As células tumorais de Walker-256 foram mantidas em laboratório através da passagens semanais de células viáveis para a cavidade abdominal de ratos Wistar adultos machos. 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, massageando-se as vísceras. Cada animal foi sacrificado por decapitação, seguindo-se a abertura da cavidade peritoneal e retirada de todo o líquido ascítico com o auxílio de uma pipeta. Após a centrifugação a 600 g, 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/0,5ml eram injetadas na cavidade abdominal de outro rato para a manutenção das células tumorais.

5.3. Implantação das células tumorais e cálculo do volume tumoral

Nos grupos experimentais com o tumor (n=20), os animais foram anestesiados por inalação com éter etílico e foram inoculadas 8×10^7 células /0,5 ml na região posterior do flanco direito por via subcutânea com seringa e agulha de 0,45 x 13 (26G). Nos 10 animais do grupo controle, foram injetados 0,5 ml de PBS na mesma região por via subcutânea.

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: $V_t = C_t \times L_t \times (P_t - p_{fle}) \times 0,52333$; 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) (Mayr et al, 2002).

5.4. Teste funcional da glândula adrenal

Duas coortes de animais foram utilizadas neste trabalho. Em um primeiro experimento avaliamos a atividade funcional do córtex da adrenal através do teste com o estímulo pelo ACTH sintético. Os animais foram divididos em grupo controle e grupo com tumor (n=8) sendo acompanhados até o 12º dia de evolução tumoral. Os animais foram anestesiados com solução de xilazina e ketamina nas concentrações de 13 Mg / kg e 90 Mg / kg i.p. Depois de 5 minutos, foi realizado um corte no final da cauda para coleta de sangue, em um microtubo heparinizado para a dosagem da corticosterona basal. Para o teste de estímulo da adrenal, ACTH sintético 1-24 (Synacthen®, Novartis Pharma) foi administrado aos animais na concentração de 42 pmol/Kg i.p. e o sangue foi coletado em microtubos heparinizados depois de 15 minutos, através de punção intracardíaca seguida de deslocamento cervical dos animais.

5.5. Dosagem da corticosterona plasmática

A dosagem da corticosterona plasmática foi avaliada nas amostras em duplicata, através de ensaio imunoenzimático de acordo com as recomendações do fabricante (corticosterone EIA Kit, Cayman Chemical). O ensaio imunoenzimático baseia-se 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 analitocorticosterona a ser dosado varia, a quantidade de AChE que se liga ao anticorpo (Ac) é inversamente proporcional à concentração do analitocorticosterona 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 analitocorticosterona 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.

5.6. Eutanásia dos animais e coleta dos órgãos

Em um segundo experimento, os animais foram decapitados após 5 e 12 dias de evolução tumoral, sob anestesia geral inalatória prévia, com éter etílico, sendo realizada necropsia detalhada, com dissecação, análise macroscópica e pesagem da massa tumoral, da glândula hipófise e das glândulas adrenais. Todo o procedimento descrito atende às exigências do Comitê de Ética em experimentação Animal, sendo parte integrante do projeto previamente aprovado nº 43/07 (CEUA/UEL). Seguindo a coleta das amostras, as adrenais e as hipófises foram fixadas em formaldeído 10% para processamento histológico e estudo imuno-histoquímico.

5.7. Determinação do índice de caquexia

Para o cálculo da alteração ponderal da massa corpórea dos animais, foi utilizada a seguinte fórmula:

%perda da massa corpórea = $(mie - mfe + mt + gmc) \times 100 / (mie + gmc)$, sendo:

mie:massa corpórea inicial do rato

mfê:massa corpórea final do rato inoculado com o tumor

mt:massa tumoral

gmc:ganho de massa do rato controle.

Os animais foram considerados caquéticos quando apresentaram uma perda de massa corpórea maior que 10%.

5.8. Processamento histopatológico e reação de imuno-histoquímica

Após fixação por 12-24 horas com formaldeído a 10%, a hipófise e as adrenais foram processadas pelas técnicas tradicionais de inclusão em parafina, realizando cortes histopatológicos de 5 µm e corados pelo método hematoxilina-eosina (HE).

O estudo imunohistoquímico das adrenais e das hipófises foi realizado em cortes histológicos de 4µm de espessura, suspensos em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão, com as lâminas imersas em solução tampão EDTA a 4% durante 1 minuto e 12 segundos, após o que se resfriaram as lâminas em temperatura ambiente por pelo menos 20 minutos. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se o peróxido de hidrogênio a 10%, imergindo as lâminas durante 10 minutos e após lavagem em solução salina tamponada de fosfatos (PBS, pH 7,4). Foram utilizados os anticorpos policlonal de coelho anti-ACTHhumano (Dbiosys, Califórnia, USA; 1:250) e o anticorpo policlonal de coelho anti- HSD3B1(Bioss, Londres, Reino Unido; 1:100). Os anticorpos primários foram aplicados diluídos em soroalbumina bovina (BSA) a 1%, nas concentrações referidas acima, sendo incubados pernoite em camara úmida a 4%. Em seguida foram lavadas em PBS por 30 minutos, sendo colocado como anticorpo secundário o polímero (polydector), por 30 minutos. A reação final foi revelada imergindo as lâminas em 3,3-diaminobenzidina tetra-hidroclorido (DAB) por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas pela hematoxilina de Harris por 5 minutos, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, imersas em xilol e montadas utilizando lamínulas.

5.9. Interpretação das lâminas e morfometria computadorizada

As lâminas preparadas com a coloração de HE e as da reação imunohistoquímica das hipófises e das adrenais dos animais, foram avaliadas em microscópio óptico (NIKON E-100) quanto a morfologia dos tecidos e fotografadas com uma câmera (CCD – Samsung), acoplada ao microscópio. Para a medida da espessura do córtex da adrenal, utilizou-se as lâminas de HE, num aumento de 100x, utilizando-se uma régua acoplada a ocular do microscópio. Para a quantificação da imunohistoquímica nos tecido da adrenal e da hipófise, escolheu-se a área de maior positividade dos anticorpos, a qual foi fotografada no aumento de 10x e 4x respectivamente. Utilizando método de morfometria computadorizada, foi realizada extração do background, cálculo de área total do tecido e determinação da coloração marrom (DAB/peroxidase) para captura de imagem contendo células com imunomarcção positiva, quantificada em pixels² (programa Image J, NIH, Bethesda, MD). Foi realizado o cálculo da área marcada relativa a área total e os valores foram expressos em porcentagem de pixels (pixels das células positivas/pixel total do tecido).

5.10. Análise estatística

Para as variáveis quantitativas, foram observados o valor máximo e o mínimo, o cálculo das médias e o erro-padrão da média, sendo utilizado o programa GraphPadPrism 4.02. A hipótese de igualdade de médias entre dois grupos foi verificada por meio do teste 't' de Student e entre três grupos por meio de análise de variância (ANOVA). O teste de Pearson foi utilizado para avaliar correlações entre as variáveis. Um valor $p < 0,05$ foi considerado como significativo em todos os testes.

6. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de um artigo científico, redigido em inglês para ser submetido a publicação em um periódico indexado ao Medline, apresentando a totalidade dos resultados dessa dissertação.

Impaired Glucocorticoid Synthesis in cancer cachexia-anorexia syndrome in an experimental model

Running title: HPA axis in cancer cachexia

ABSTRACT

The adrenocorticotrophic hormone (ACTH) acts in the metabolism regulation through the control of adrenal synthesis of glucocorticoids; these hormones have important physiological and anti-inflammatory actions, during an injury or illness. In consumptive syndromes, such as neoplastic cachexia, corticotrophic axis is a critical component of the adaptive neuroendocrine responses. To study the morphological and physiological alterations of the pituitary and adrenal glands during cancer development, we used an experimental model of tumor-induced cachexia and anorexia by inoculating Walker-256 cells in rats which experienced two different stages of cancer development. After the functional test with ACTH₁₋₂₄ to evaluate the adrenal function, the tumor was dissected and the pituitary and adrenals glands were removed for histopathological and immunohistochemical studies. The results showed a marked weight loss early on day 5 of tumor development with 12% cachexia index. Morphological changes such as cell growth in the adrenal cortex and increased size of the corticotropin cells in the pituitary anterior lobe were also evidenced with few differences at day 12. Despite the signs of HPA axis activation as adrenal and pituitary morphometry and the immunoreactivity for ACTH, the functional test with ACTH₁₋₂₄ and the adrenal immunostaining for 3 β HSD pointed to adrenal insufficiency. Both hyperlasia and hypertrophy of pituitary and adrenal glands are morphological changes resulted from the activation of corticotrophic axis in response to stress and occurred early in the development of neoplastic cachexia in Walker-256 tumor bearing rats, since this response was associated with insufficient secretion of corticosterone and low levels of the steroidogenic enzyme 3 β HSD during the development of the cachexia anorexia syndrome, thus suggesting primary adrenal insufficiency.

Key words: ACTH, cachexia, cancer, adrenal, glucocorticoid, pituitary.

INTRODUCTION

The cachexia-anorexia syndrome (CAS) is a multifactorial syndrome that results from several abnormalities of metabolism, like muscle proteolysis, lipolysis in adipose tissue, increased fat mobilization, hepatic neoglycogenesis and peripheral glucose resistance, accompanied by profound weakness, anorexia and anemia (Laviano et al, 2008). This syndrome occurs in chronic processes including cancer, AIDS, diabetes mellitus and severe rheumatoid arthritis (Evans et al, 2008). Although cachexia always includes a component of reduction in food intake, it differs from malnutrition and depletion by the fact that there are also metabolic alterations and inflammatory mediators involved such as peptide hormones, neurotransmitters and cytokines (Laviano et al, 2005; Tisdale, 2009). This means that the loss of body mass can occur more quickly than expected simply on reducing of food intake of equal magnitude, and also the loss can be higher for non-fatty tissue in relation to fat (Cassolla et al, 2012).

The experimental model of cachexia in rats, induced by the Walker tumor, is widely used for the understanding of the neoplastic cachexia. The Walker-256 carcinosarcoma was developed from a spontaneous carcinoma originate in the mammary gland of albino pregnant rats to establish the tumor cell line LLC-WRC 256. Since then, these cells has been kept largely in the form of carcinosarcoma highly invasive and undifferentiated, being an important resource in basic research (Corbello Pereira et al, 2004). Various aspects relating to their biological behavior as their ability to induce a rapidly state of neoplastic cachexia and their biochemical alterations have been studied (Moreira et al, 2013).

The hypothalamus-pituitary-adrenal axis, known as HPA axis, and the sympatho-adrenomedullary axis are the primary systems that are responsible for the homeostasis during stress, and the adrenal gland is an essential organ that is common to both systems (Ulrich-Lai et al, 2006). The adrenal gland participates in the acute and chronic response to stress with a medullar response with secretion of adrenaline and noradrenaline under the influence of the autonomic nervous system and with a cortical response with the glucocorticoid secretion under the influence of the HPA axis (Chikanza& Grossman, 2000). The corticotrophin releasing hormone (CRH) is the main control of the HPA axis from the paraventricular nuclei of the hypothalamus, which stimulates the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion from the pituitary gland (Chrousos, 1995). The target organ of the HPA axis is the adrenal gland, whose cortical layer contains a number of enzymes responsible for the steroidogenesis,

activated by the ACTH binding to its receptor MC2R (type 2 receptor for melanocortin or corticotropin receptor) (Clark et al, 2003). ACTH controls the cell proliferation and the steroidogenic activity of the gland. Its suppression leads to the adrenal cortex atrophy while ACTH excess causes hyperplasia of reticular and fascicular zones.

The interaction between HPA axis and cancer development is not fully understood and raises clinical concerns. Corticosteroids have potential usefulness in the treatment of anorexia-cachexia syndrome in cancer; on the other hand, glucocorticoid excess can induce cachexia and might contribute to cancer progression (Tisdale, 2009). Experimental model is a valuable tool to address such a question. We have demonstrated that stimulated steroid secretion was significantly decreased in the model of neoplastic cachexia induced by Walker tumor, by measuring the plasma corticosterone response to submaximal doses of ACTH. To clarify the pathophysiological basis of this suppression, we followed the growth of Walker tumor until the last stage of cancer development characterized by adrenal hyporesponsiveness. The purpose of this study was to assess the effects of the tumor-induced cachexia syndrome on the adrenal and pituitary glands. Hence, the morpho-functional integrity of the main endocrine components of the HPA axis was examined in both short-term and long-term tumor development.

MATERIALS AND METHODS

Animals and cell inoculation

Male Wistar rats weighting 200–250 g, kept at temperature of 23.2°C, light/dark cycle of 12 h and with free access to water and standard rodent chow diet were used. Pair feeding control was not performed since no difference was observed in our previous analysis of adrenal and pituitary glands from control animals.

Walker-256 cells, cultivated intraperitoneally in rats, were collected, centrifuged, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS; 16.5mmol/L of phosphate, 137mmol/L of NaCl and 7mmol/L of KCl), pH 7.4, and the cell viability was evaluated using the method of trypan blue exclusion. Tumor-bearing rats were inoculated subcutaneously with 8.0×10^7 viable tumor cells/animal in the right rear flank. Control rats were inoculated with PBS in the same inoculation site. The protocols of the experiments were approved by the Ethics Committee for Animal experimentation of the State University of Londrina.

Experimental design

Two cohorts of rats were used in this study. The first cohort was evaluated for functional activity of the adrenal cortex with the ACTH synthetic challenge test. Both control and tumor group (n=8) were followed until the 12th day of tumor evolution. Then, animals were anesthetized i.p. with xylazine (19 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg) solution. After 5 minutes, blood was collected in heparinized microtube for the measurement of basal corticosterone. For the adrenal stimulus test, synthetic ACTH 1-24 (Synacthen®, Novartis Pharma) was administered at a concentration of 42 pmol/Kg i.p. and the blood was collected in heparinized microtube after 15 minutes, followed by cervical dislocation. Plasma corticosterone levels were assessed in duplicated samples by immunoassay, according to the recommendations of the supplier (corticosterone EIA Kit, Cayman Chemical).

In the second cohort of rats, they were divided into the three following groups (n=10): rats with Walker-256 tumor sacrificed on days 5 and 12 after implantation of tumor (tumor-bearing rats) and rats without tumor (control rats). Those animals were subjected to the study of weight changes and histopathology analyses of adrenal and pituitary tissues.

Characterization of cachexia and evaluation of related parameters

For the second cohort of rats, on the 5th and 12nd days, rats were weighed, euthanized and their adrenal, pituitary and tumor mass were carefully dissected and weighed to calculate the percentage of body mass loss (cachexia index), expressed in %. For this evaluation, we used the following parameters: initial weight (iw), final weight in the rat with tumor (fw), tumor mass (tm), and weight gain in control rat (wgc), accordingly to the formula:

$$\% \text{ lost of body mass} = (iw - fw + mt + wgc) \times 100 / (mie + wgc).$$

The host weight was defined as the total body weight of the animal subtracting the tumor weight. The tumor volume was measured with a caliper at different days of tumor development until the sacrifice day; for this purpose, we used a volume ellipsoid formula (length x depth x width x 0.5233) (Mayr et al, 2002).

Histopathological study

The pituitary and adrenals were fixed in buffered 10% formaldehyde and then paraffin embedded for conventional morphology study. Longitudinal pituitary and adrenal sections were stained with haematoxylin and eosin stain. The morphological and morphometrical analysis was done on 4 μm sections with light microscopy. The morphometrical analysis of adrenal cortex was performed using a millimeter scale in the eyepiece of a Nikon microscope (E-200, Tokio, Japan) with 10 x objective.

For immunohistochemical reaction, paraffin embedded adrenal and pituitary sections were dewaxed, hydrated and heat treated in 1 mM EDTA buffer for antigenic unmasking on microwave at 95.8°C for 20 min. Sections were incubated overnight at room temperature with rabbit polyclonal anti-ACTH (Dbiosys, California, USA; 1:250) to identify the corticotrophs cells in the anterior lobe of the pituitary and the adrenal sections with rabbit polyclonal anti-3 β HSDI (3-beta-hydroxysteroid-dehydrogenase) (Bioss, London, UK; 1:100) to identify the immunoexpression of the enzyme in the adrenal cortex cells. Immunohistochemical staining was done using the polymer peroxidase based method, followed by development with diaminobenzidine. A methodical negative control went through the first step of the procedure (incubation with vehicle instead of the primary antibody).

Digital computer-assisted immunohistochemistry quantification

Histological slides were analyzed under the optic microscope to identify areas that best represented 3 β HSDI or ACTH immunostaining, whereas brownish-color was considered to be evidence of a positive expression. From each sample, photomicrographs of 800x600 pixels were obtained from x4 magnification fields, using a Samsung camera (three images/slice), adapted in the optic microscope. Digitally acquired images were analyzed with ImageJ 1.44 software for Windows (Java image software in public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), using the threshold tool with color-based selection for positive staining. The number of pixels included in the selected color range was divided by the total number of pixels in each field. Four slices per sample of tissue were analyzed and data were averaged. Results were expressed by the relation between the immunopositive area fraction per total area fraction.

Statistical procedures

One-way ANOVA was used to compare variables at the end of the experiments. When the overall ANOVA was significant, pairwise comparisons were performed using Tukey's method. The *t*-test was used to compare two groups and the Pearson test was used for evaluate the correlation between two variables. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was considered significant in all tests.

RESULTS

The evaluation of the basal plasma levels of corticosterone showed no significant difference between the control and tumor groups. However, after the adrenal cortex stimulation test, we observed a significant reduction in corticosterone secretion in tumor bearing rats of approximately 24% (fig. 1).

Rats weighted approximately 220 g (211-227) before tumor inoculation. While the control group experienced an increase of 9% and 21% of body weight on days 5 and 12, the tumor bearing rats had $2 \pm 0.34\%$ and $19 \pm 0.2\%$ of gain when compared with the first day. This expressive gain of body weight in tumor bearing rats on the 12th day was due to the presence of the tumor mass. In fact, there was about 10% decrease in the host body weight if the tumor mass was subtracted from the whole body (fig. 2). Similarly to the lost weight, there was a reduction of approximately 37% in food intake of tumor bearing rats when compared with controls animals, considering the mean of the five last days (data not shown). In studied tumor bearing rats, we observed a progressive increase in both tumor volume and in the tumor mass (fig. 3 A, B), as expected by its malignance; Its weight reached approximately 5 ± 0.6 g on day 5 and 23 ± 1.6 g on day 12 after the cell inoculation. Tumor bearing rats but not control rats developed anorexia and lost body mass at an early stage of tumor development, from the 5th day, the loss of body mass resulted in significant and progressive cachexia index higher than 10 % (fig. 3C).

In our study, weight and morphology of adrenal and pituitary glands were evaluated in both control and tumor groups. Absolute adrenal weight in tumor bearing rats on days 5 and 12 was increased by 73 and 50 % respectively, compared with the control rats (fig. 4 A). The adrenal weight relative to the body weight was also increased in tumor bearing rats ($p < 0.05$)

(fig. 4 B). By the analysis of the adrenals gland at the optic microscope, cortex and medulla were evidenced as two distinct regions, without any tumor metastasis that could increase the glandular weight (suppl. fig.1). The measurement of cortex width showed enlargement by $34.2\pm 1,8\%$ and $22,1\pm 0,6\%$ in tumor bearing rats on days 5 and 12 respectively, compared with control (fig. 4 C). This increase was mainly due to the hypertrophy of the cells in the fascicular zone, the main site of glucocorticoids synthesis. The pituitary weight in tumor bearing rats on days 5 and 12 was increased by $55.1\pm 1.3\%$ and $47.2\pm 1.6\%$, compared with control rats (fig. 5 A). We also observed increase in the pituitary weight relative to the body weight in tumor bearing rats on days 5 and 12 in comparison with the control rats (fig. 5 B), but no difference in the pituitary architecture was evidenced by the optic microscopic analysis after HE staining (data not shown). On calculating Pearson's correlation coefficient, the comparison between relative adrenal and pituitary weights resulted in significant moderate positive correlation (fig. 6A). Regarding the other morphometrical parameters, there was no correlation between them and the development of tumor or cachexia, excepting the pituitary weight that was positively correlated to the tumor weight (fig. 6B).

The 3β HSD enzyme plays a crucial role in the biosynthesis of all classes of hormonal steroids. Immunohistochemical studies reveal its localization in the three layers of the adrenal cortex, with a cytoplasmatic expression as evidenced by our results (suppl. figure 2). The quantitative analysis of the immunoexpression for the enzyme 3β HSD has been well correlated with the glucocorticoid synthesis and the functional test (Mazzuco et al, 2006). The immunoexpression of the enzyme 3β HSD in the adrenal cortex was reduced in adrenal glands from tumor bearing rats. The stain area to total tissue area ratio in control rats and tumor bearing rats on days 5 and 12 after the tumor implantation was respectively 2.91 ± 0.57 , 0.56 ± 0.11 and 0.58 ± 0.16 (figure 7). Immunocytochemical reactions for ACTH revealed numerous immunoreactive cells in the anterior lobe of the pituitary forming groups and single cells, diffusely distributed throughout the gland (suppl. figure 3A). The intermediate lobe presented strong staining but it was excluded from the selected area during digital computer-assisted immunohistochemistry quantification, because intermediate cells have diverse functional and morphological features. In shape, the corticotrophs were usually triangular or stellate, rounded cells were also seen with a cytoplasmatic ACTH immunostaining in the anterior lobe (suppl. figure 3B). The immunohistochemistry study of the pituitary gland demonstrated increase by 53% in the ACTH immunoreactivity in the anterior lobe of the pituitary on day 5, which was sustained on day 12 (figure 8).

In order to evaluate the HPA response in cachexia tumor induced, we compared histopathological, morphometrical, functional and immunohistochemical data. There was no statistically significant correlation between the immunoexpression of the ACTH and the 3 β HSD or between each of them and the body weight loss.

DISCUSSION

The loss of weight and body mass index characterize the state of cachexia, which may be mediated by an increase in circulating levels of inflammatory cytokines, as an adaptative response to the aggression triggered by growth of the tumor mass. According to this, the tumor volume increased significantly in our experiment in parallel to the development of CAS in Walker tumor bearing rats. It is known that the development and progression of cancer cells can acutely induce the production of cytokines which interact with immune and inflammatory cells activating the HPA axis (Tisdale, 2008) but the effect of the disease progression on the endocrine glands have never been studied. In the present study, the morpho-functional evaluation of adrenal and pituitary glands suggested that the synthesis of glucocorticoids suffers an impairment during the modulation of the HPA axis.

In our study we observed an increase in the morphometric parameters of the adrenal and pituitary gland in tumor bearing rats compared with control. Both endocrine glands suffer adaptation process, like hypertrophy and hyperplasia, during disturbances of homeostasis under modulation of the HPA axis. The first effect induced by ACTH is hypertrophy of the adrenal cells and hyperplasia only occurs if the stimulus is maintained long enough (Ferreira et al, 2007). Such data could explain the increase in adrenal weight and hypertrophy probably occurring around 24 h after ACTH stimulation and thereafter. A moderate correlation between the relative weight of the adrenal and pituitary gland observed in our study, demonstrates that the stimulation of the HPA axis had occurred in the same manner on the two glands.

We used immunohistochemistry to better characterize the adrenal and pituitary glands hormone production. Quantitative immunohistochemistry methods has been a good approach to study peptides contents, and these data showing good correlation with absolute concentrations of the peptides like ACTH, as measured by RIA (radioimmunoassay) in glands extracts (Berkenbosch&Tilders, 1988). The regulation of ACTH synthesis and its secretion is a complex process; corticotrophin releasing hormone (CRH) is the most important hypothalamic factor that stimulate pituitary function and hypertrophy, and also induces feeding inhibition. Thus, the increase in the ACTH immunoexpression observed in our study

is possibly due to the CRH hypersecretion by hypothalamic neurons (Wang & Kotz, 2002). High CRH levels can contribute to the decrease of food ingestion by the animals inoculated with tumor (Davis et al, 2004).

Despite the signs of HPA axis activation according to adrenal and pituitary morphometry and the immunoreactivity for ACTH, we had observed a significant decrease in the corticosterone secretion after the synthetic ACTH stimulation test and a decrease in the 3 β HSD enzyme immunoreexpression indicating impaired activity of steroidogenic cells mainly in the fascicular layer of the adrenal gland. Some studies in cancer states demonstrated progressive reduction in plasma levels of corticosterone in tumor-bearing mice, indicating the reduction of adrenal function (Ostrander et al, 2006). Failure to produce adequate levels of glucocorticoids can occur due to a disorder of the adrenal glands themselves (primary adrenal insufficiency) or to the inadequate secretion of ACTH or CRH by the pituitary gland or hypothalamus (secondary adrenal insufficiency) (Cooper & Stewart, 2003; Prigent et al, 2004).

The hypocortisolism is a common disorder observed during severe illness because many factors can disrupt HPA function, including the high level of inflammatory cytokines. Necrosis or hemorrhage of the hypothalamus or the pituitary gland, observed in severe conditions like sepsis, are related with secondary adrenal insufficiency (Sharshar et al, 2004). Circulating proinflammatory mediators, such as TNF- α , may block the ACTH release and the local expression of TNF- α and IL-1 β may interfere with CRH and ACTH synthesis (Prigent et al, 2004). These are improbable conditions in our study because the pituitary gland demonstrated signs of increased synthesis of ACTH.

While circulating proinflammatory cytokines such as TNF- α may inhibit ACTH-induced cortisol release, the neutrophil-derived corticostatinins such as α -defensins can compete with ACTH for binding on its cognate receptor, resulting in adrenal insufficiency (Solomon, 1993; Xia et al, 2011). Corticosterone synthesis is dependent on an adequate supply of cholesterol to the adrenal cortex and high density lipoprotein (HDL) appears to be the more important source for its production in rodents. HDL cell uptake occurs via a scavenger receptor (SR-BI) (Cai et al, 2008); previous studies observed a decreased in HDL-cholesterol in both experimental animals and human subjects with cancer (Esper & Harb, 2005). These conditions could explain the physiopathology of Walker-induced tumor cachexia with ACTH hypersecretion and corticosterone hyposecretion. Moreover, in some aggressive types of cancer there is the possibility of injury by direct adrenal metastasis impairing adrenal function (Muth et al, 2010), but it was not observed in our experiments.

The increase in the morphometric parameters of the pituitary and adrenal glands found in our study is related to the development of CAS and reflecting a stress response to the homeostasis disturbances in the beginning of the disease, but is not a demonstration of sustained hypercorticism. Such changes found in the corticotrophic axis could contribute to the worsening of anorexia, weight loss and fatigue in advanced stages of cancer, which is consistent with primary adrenal insufficiency. Understanding the activity of the HPA axis in this condition may indicate possible targets for pharmacological intervention in the treatment of this syndrome related to cancer.

REFERENCES

- Berkenbosch F, Tilders FJ (1988) Effect of axonal transport blockade on corticotropin-releasing factor immunoreactivity in the median eminence of intact and adrenalectomized rats: relationship between depletion rate and secretory activity. *Brain Res***442**: 312-320
- Cai L, Ji A, de Beer FC, Tannock LR, van der Westhuyzen DR (2008) SR-BI protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. *J Clin Invest***118**: 364-375
- Cassolla P, Moreira CC, Liboni TF, Zaia CT, Borba-Murad GR, Bazotte RB, de Souza HM (2012) Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumour-induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. *Cell Biochem Funct***30**: 265-270
- Chikanza IC, Grossman AB (2000) Reciprocal interactions between the neuroendocrine and immune systems during inflammation. *Rheum Dis Clin North Am***26**: 693-711
- Chrousos GP (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med***332**: 1351-1362
- Clark AJ, Baig AH, Noon L, Swords FM, Hunyady L, King PJ (2003) Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R). *Ann N Y Acad Sci***994**: 111-117

Cooper MS, Stewart PM (2003) Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med***348**: 727-734

Corbello Pereira SR, Darronqui E, Constantin J, da Silva MH, Yamamoto NS, Bracht A (2004) The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. *BiochimBiophysActa***1688**: 187-196

Davis MP, Dreicer R, Walsh D, Lagman R, LeGrand SB (2004) Appetite and cancer-associated anorexia: a review. *J ClinOncol***22**: 1510-1517

Esper DH, Harb WA (2005) The cancer cachexia syndrome: a review of metabolic and clinical manifestations. *NutrClinPract***20**: 369-376

Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD (2008) Cachexia: a new definition. *ClinNutr***27**: 793-799

Ferreira JG, Cruz CD, Neves D, Pignatelli D (2007) Increased extracellular signal regulated kinases phosphorylation in the adrenal gland in response to chronic ACTH treatment. *J Endocrinol***192**: 647-658

Laviano A, Inui A, Marks DL, Meguid MM, Pichard C, Rossi Fanelli F, Seelaender M (2008) Neural control of the anorexia-cachexia syndrome. *Am J PhysiolEndocrinolMetab***295**: E1000-1008

Laviano A, Meguid MM, Inui A, Muscaritoli M, Rossi-Fanelli F (2005) Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself. *Nat ClinPractOncol***2**: 158-165

Mayr NA, Taoka T, Yuh WT, Denning LM, Zhen WK, Paulino AC, Gaston RC, Sorosky JI, Meeks SL, Walker JL, Mannel RS, Buatti JM (2002) Method and timing of tumor volume measurement for outcome prediction in cervical cancer using magnetic resonance imaging. *Int J RadiatOncolBiolPhys***52**: 14-22

Mazzuco TL, Chabre O, Sturm N, Feige JJ, Thomas M (2006) Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology***147**: 782-790

Moreira CC, Cassolla P, Dornellas AP, de Morais H, de Souza CO, Borba-Murad GR, Bazotte RB, de Souza HM (2013) Changes in liver gluconeogenesis during the development of Walker-256 tumour in rats. *Int J ExpPathol***94**: 47-55

Muth A, Persson F, Jansson S, Johanson V, Ahlman H, Wangberg B (2010) Prognostic factors for survival after surgery for adrenal metastasis. *Eur J SurgOncol***36**: 699-704

Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Richtand NM, Herman JP (2006) Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology***147**: 2008-2017

Prigent H, Maxime V, Annane D (2004) Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. *Crit Care***8**: 243-252

Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Françoise G (2004) The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol***14**: 21-33

Solomon S (1993) Corticostatins. *Trends EndocrinolMetab***4**: 260-264

Tisdale MJ (2008) Catabolic mediators of cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care***2**: 256-261

Tisdale MJ (2009) Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev***89**: 381-410

Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP (2006) Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J PhysiolEndocrinolMetab***291**: E965-973

Wang C, Kotz CM (2002) Urocortin in the lateral septal area modulates feeding induced by orexin A in the lateral hypothalamus. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol***283**: R358-367

Xia HM, Fang Y, Huang PL (2011) Tumor necrosis factor alpha affect hydrocortisone expression in mice adrenal cortex cells mainly through tumor necrosis factor alpha-receptor 1. *Chin Med J (Engl)***124**: 2728-2732

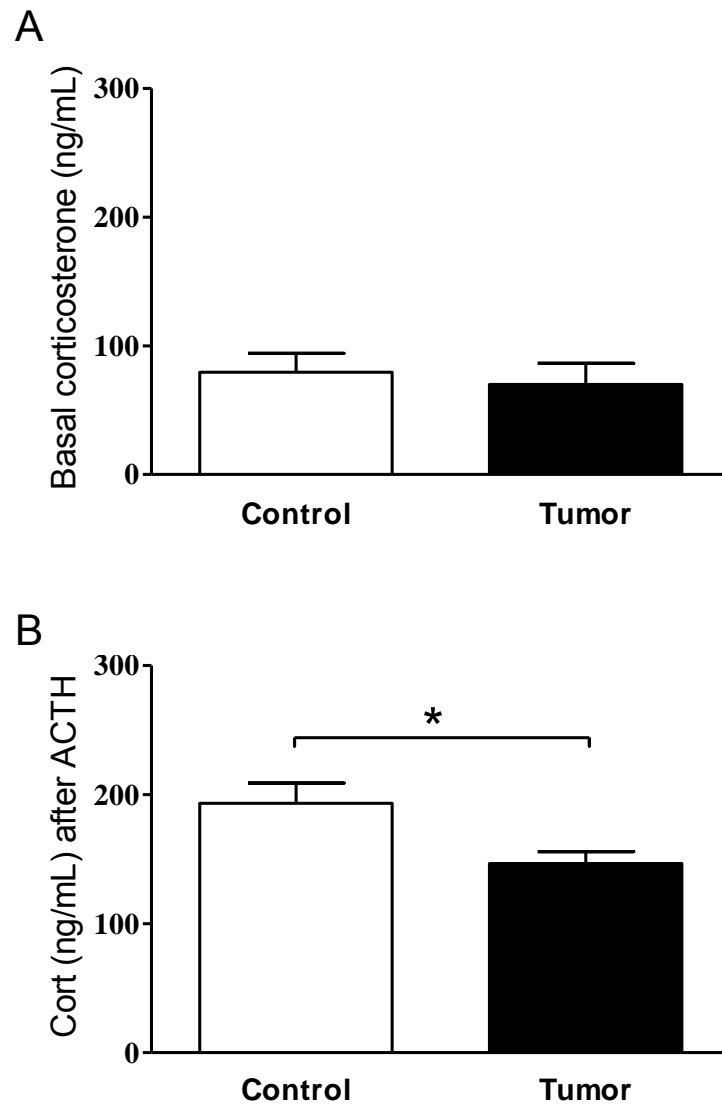


Figure 1. Glucocorticoid function of the adrenal cortex. A. Basal plasma corticosterone level; B. Plasma corticosterone (Cort) after the stimulation test with synthetic ACTH 1-24 in control and tumor bearing rats. Each bar represents mean \pm SEM; (n=4/group). *P < 0.05 (t-test).

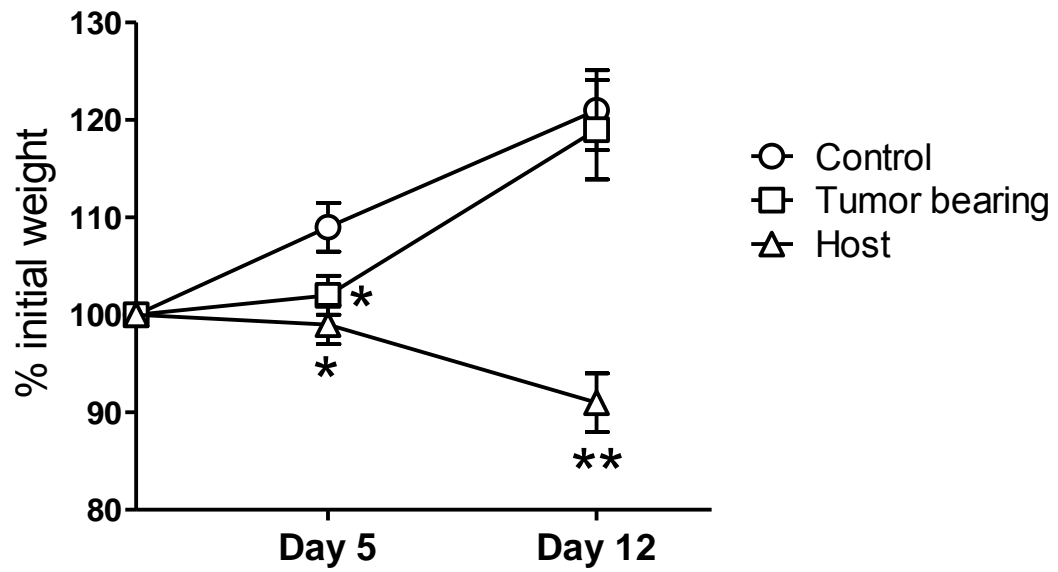


Figure 2. Time course of change in body weight, expressed as % of initial weight in control and tumor bearing animals. The host weight was calculated by subtracting the tumor weight from the total body weight. Each bar represents mean \pm SEM; (n=10/group). *P < 0.05 and **P < 0.01 versus control (t-test).

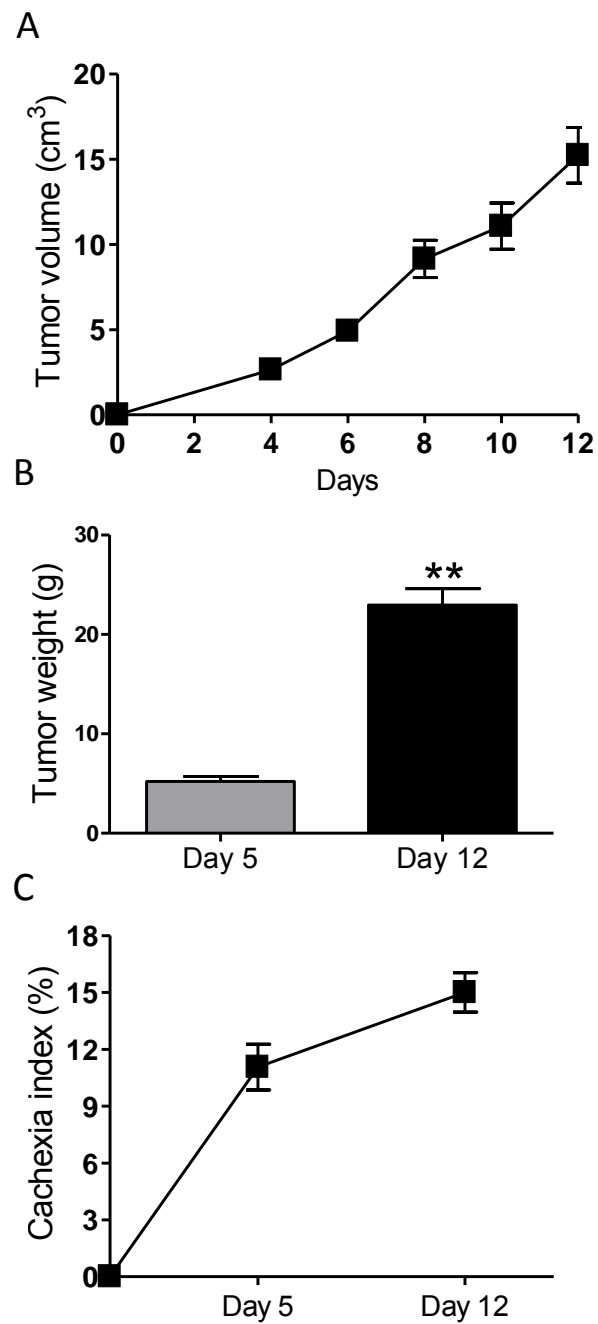


Figure 3. Tumor and cachexia measurements. A. Time course of growing palpable tumor in tumor bearing rats during the study; B. Tumor weight and C. Cachexia index in tumor bearing rats on days 5 and 12 after implantation of tumor. Each bar represents mean \pm SEM (n=10/group). **P < 0.01(t-test).

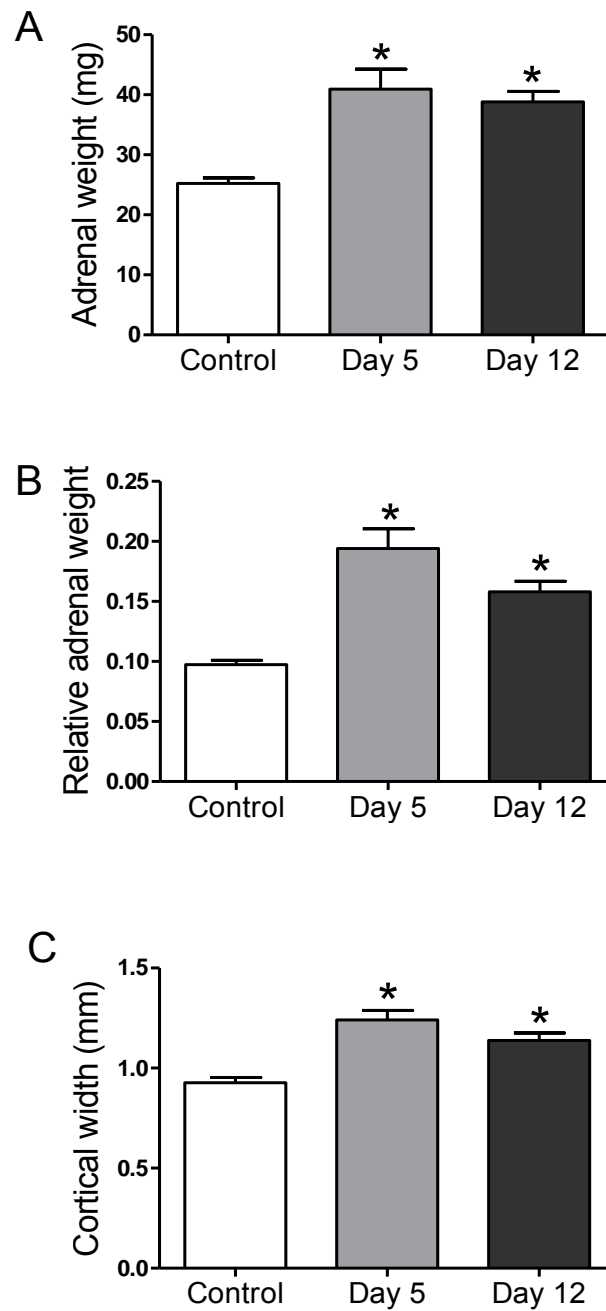


Figure 4. Adrenal morphometrical parameters. A. Adrenal weight; B. Relative adrenal weight; C. Cortical width in control and tumor bearing rats on days 5 and 12 after implantation of tumor. Each bar represents mean \pm SEM (n=10/group) * $P < 0.05$; ANOVA. There was no significant difference between days 5 and 12 in the three parameters analyzed.

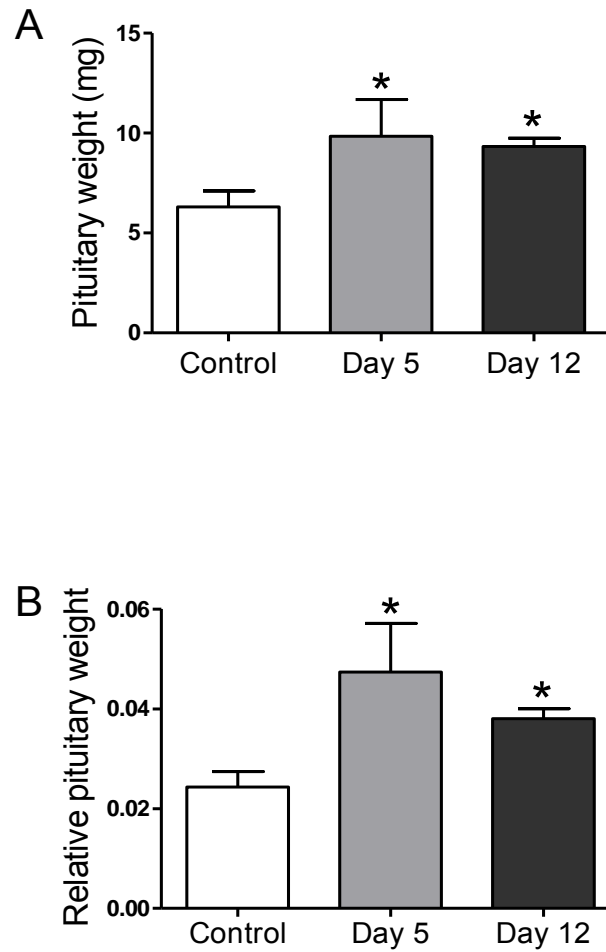


Figure 5. Pituitary morphometrical parameters. A. Pituitary weight and B. Relative pituitary weight in control and tumor bearing rats on days 5 and 12 after implantation of tumor. Each bar represents mean \pm SEM.(n=10/group) * $P < 0.05$ ANOVA. There was no significant difference between days 5 and 12 in two parameters analyzed.

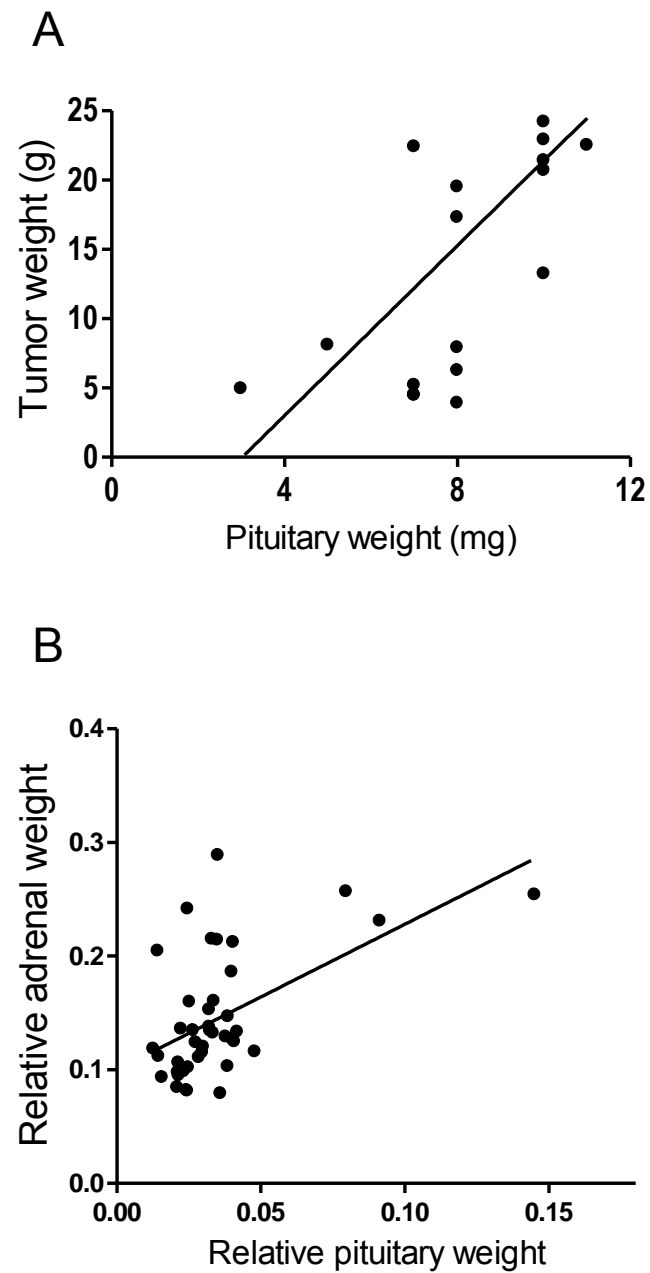


Figure 6. Comparison between tumor, pituitary and adrenal weights. A. Correlation between the pituitary weight and the tumor weight ($r=0.64$, $P=0.002$; Pearson correlation test). B. Correlation between the relative pituitary and adrenal weights in both control and tumor bearing rats ($r=0.53$, $P=0.0003$; Pearson correlation test).

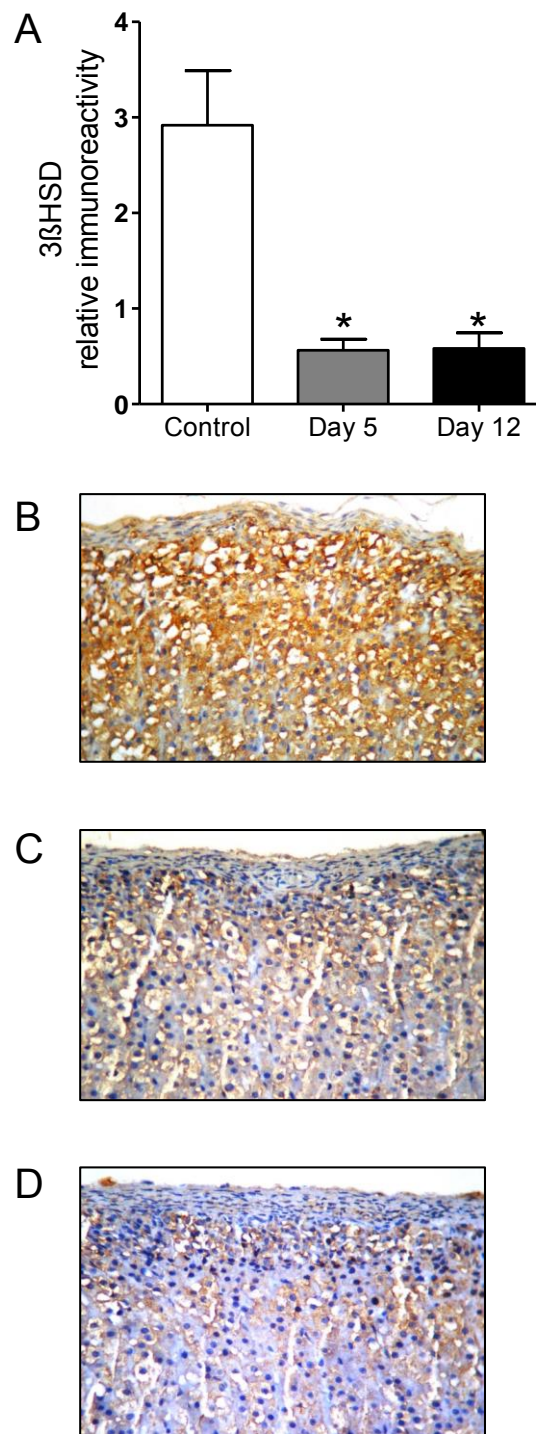


Figure 7. Tissue expression of 3β HSD by immunohistochemistry. A. Stained area relative to total tissue area of immunostaining for 3β HSD in control and tumor bearing rats on days 5 and 12 after implantation of tumor. Each bar represents mean \pm SEM of 10 to 20 animals ($*P < 0.01$); ANOVA. There was no significant difference between days 5 and 12 ($P = 0.9$). B, C and D, representative images of immunohistochemical staining of the enzyme 3β HSD (brown area) in the adrenal cortex of the three studied groups (B, control; C, day 5 and D, day 12; original magnification X40, polymer peroxidase-based method).

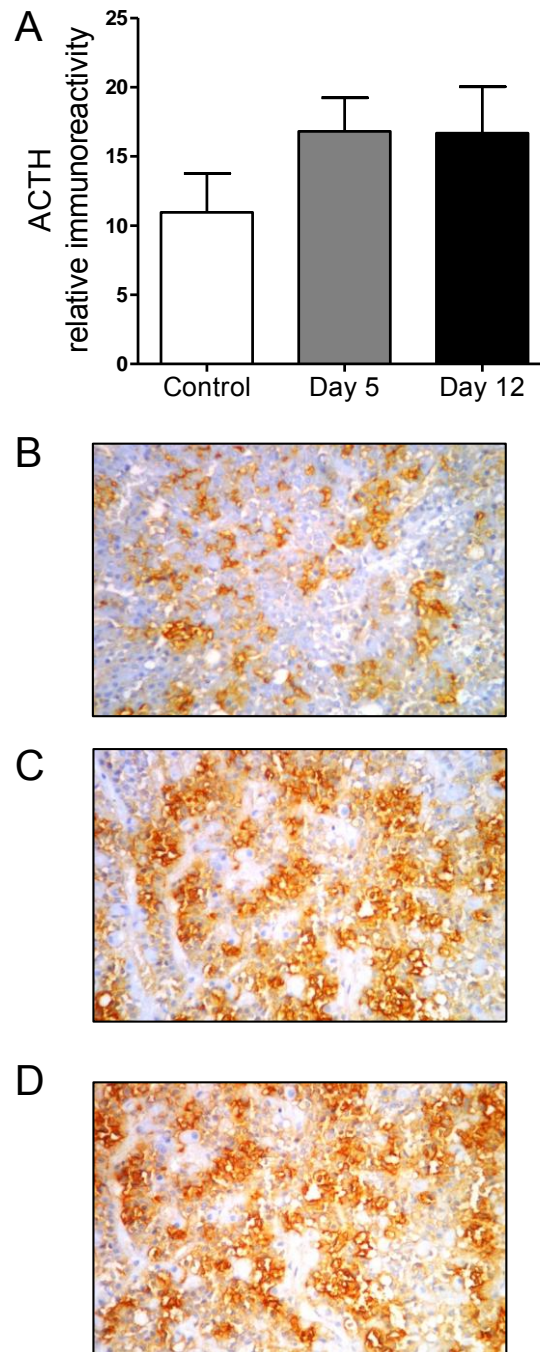
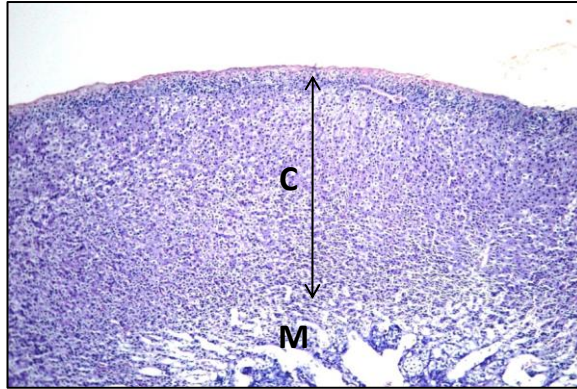
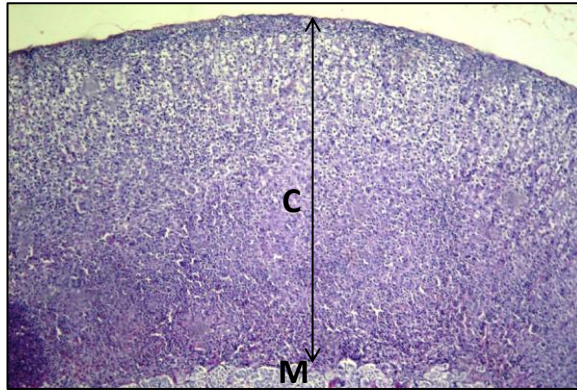


Figure 8. Tissue expression of ACTH by immunohistochemistry. A. Stained area relative to total tissue area of immunostaining for ACTH in the anterior lobe of the pituitary in control and tumor bearing rats on days 5 and 12 after implantation of tumor. Each bar represents mean \pm SEM of 10 to 20 animals ($P=0.05$, ANOVA). B, C and D, representative images of immunohistochemical staining of the ACTH (brown area) in the anterior lobe of the three studied groups (B, control; C, day 5 and D, day 12; original magnification X40, polymer peroxidase-based method).

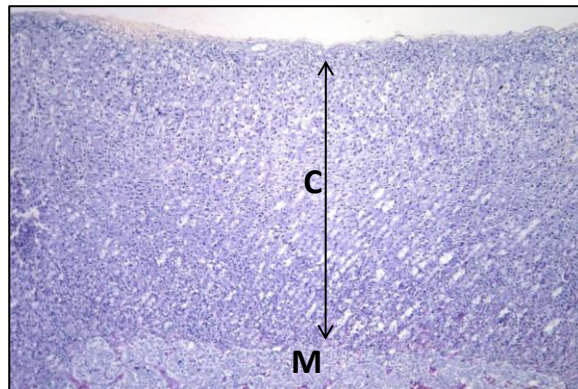
Control



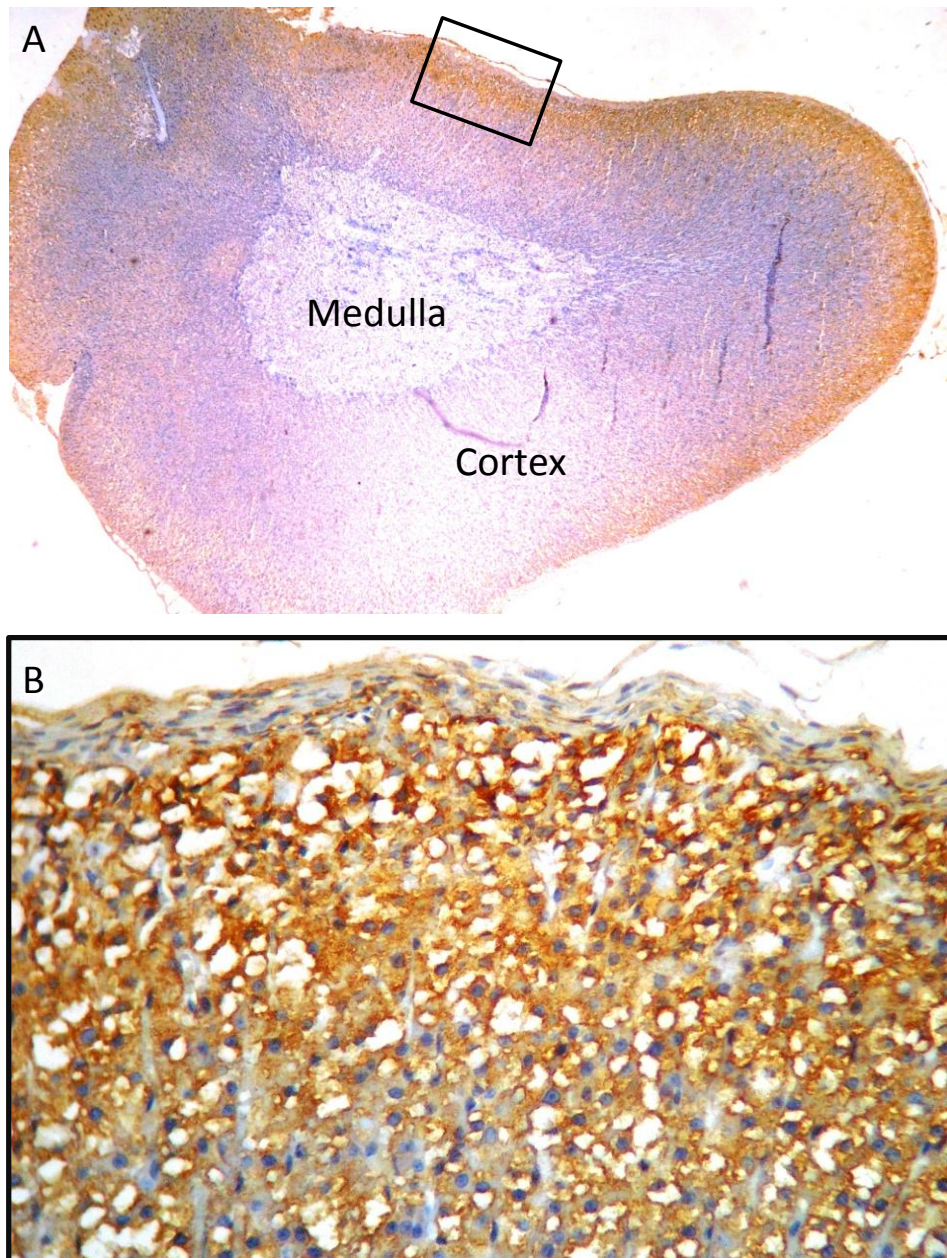
Day 5



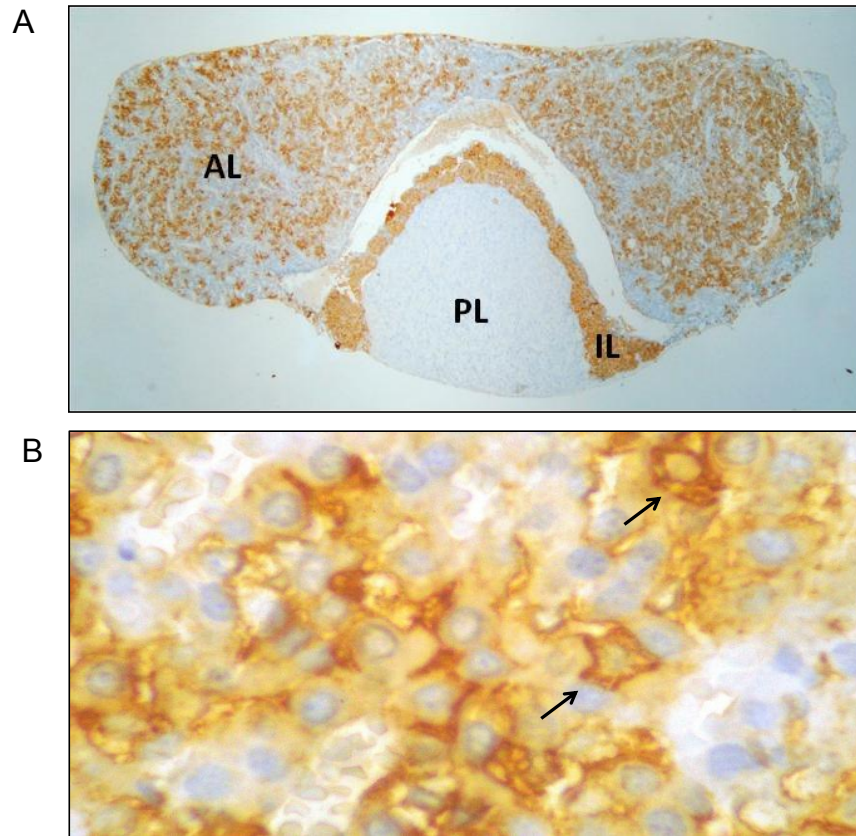
Day 12



Supplementary figure 1. Representative images of adrenal cortex used to evaluate the cortical width in control and tumor bearing rats at the indicated time after inoculation (HE, Magnification 4x). C, cortex; M, medulla.



Supplementary figure 2. Representative images of immunohistochemical staining of the 3 β HSD (brown area) in the adrenal gland from a control rat. A. Original magnification x 4, B. Inset: view of the cortex (x10); polymer peroxidase-based method.



Supplementary figure 3. Representative images of immunohistochemical staining of the ACTH (brown area) in the pituitary gland from a tumor bearing rat (day 5). A. Original magnification x 4, AL, anterior lobe, IL, intermediate lobe, PL, posterior lobe; B. View of the anterior lobe (original magnification x100), arrows indicating the corticotrophic cells; polymer peroxidase-based method.

7. CONCLUSÕES

1) Os ratos inoculados com células tumorais de Walker-256 desenvolveram tumor sólido de evolução progressiva, apresentando índice de caquexia significativo a partir do 5º dia. Em relação aos parâmetros morfométricos (peso absoluto e relativo das glândulas adrenal e hipófise, e espessura do córtex adrenal), foi observado aumento de todas as aferições, especialmente no momento que corresponde ao início da SAC. Os achados de hipertrofia e hiperplasia das glândulas estudadas indicam que a resposta anti-tumoral do hospedeiro induziu ao estímulo do eixo HPA num momento precoce após a inoculação. Na sequência da evolução temporal, as alterações morfométricas bem como histológicas são menos evidentes e sugerem remodelação parcial da estrutura dos tecidos endócrinos.

2) Quanto aos parâmetros morfofuncionais, a glândula adrenal apresentou diminuição da secreção de corticosterona após o teste funcional e diminuição da imunomarcada enzima esteroideogênica 3β HSD na camada cortical, divergindo dos achados de hipertrofia glandular e hiperplasia celular. Na glândula hipófise, observamos tendência ao aumento da imunomarcada ACTH compatível com a progressão do peso desta glândula, bem como manutenção do estímulo trófico sobre as glândulas adrenais. Ou seja, apesar da ativação do eixo HPA, a partir do 5º dia não houve maior expressão de 3β HSD que levaria à síntese de glicocorticóides. Considerando a caquexia neoplásica como um processo dinâmico e progressivo, alterações enzimáticas do córtex adrenal refletem uma resposta funcional imediata conforme evidenciamos pelo teste com ACTH, enquanto que as respostas morfológicas são fenômenos adaptativos levando um tempo maior para ser detectadas.

3) Os resultados sugerem uma resposta bifásica do eixo corticotrófico decorrente da presença do tumor. Inicialmente, as alterações morfológicas indicam uma resposta de hiperativação do eixo, causando estímulo às glândulas hipófise e adrenais. Com o desenvolvimento da SAC, a hiporesponsividade da glândula efetora caracteriza o estado de insuficiência adrenal do tipo primária. Futuros estudos poderão elucidar os mecanismos envolvidos neste processo.

REFERÊNCIAS

- Annane D, Maxime V, Ibrahim F, Alvarez JC, Abe E, Boudou P (2006) Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med***174**: 1319-1326
- Chrousos GP, Kino T (2007) Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. *Stress***10**: 213-219
- Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci***8**: 571-578
- Corbello Pereira SR, Darronqui E, Constantin J, da Silva MH, Yamamoto NS, Bracht A (2004) The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. *Biochim Biophys Acta***1688**: 187-196
- Elamin E (2011) Dietary and pharmacological management of severe catabolic conditions. *Am J Med Sci***342**: 513-518
- Fonseca EAI, Macioszek MA, Saito AY, Cotrim KG, Mazzuco TL (2009) Estudo das alterações morfológicas da glândula adrenal na caquexia neoplásica. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde***30**: 163-174
- Fujitsuka N, Asakawa A, Uezono Y, Minami K, Yamaguchi T, Niijima A, Yada T, Maejima Y, Sedbazar U, Sakai T, Hattori T, Kase Y, Inui A (2011) Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. *Transl Psychiatry***1**: e23
- INCA. (2011) Estimativa 2012: Estimativa de Câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Instituto Nacional do Câncer (INCA).
- Inui A (2002) Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin***52**: 72-91
- Laviano A, Inui A, Marks DL, Meguid MM, Pichard C, Rossi Fanelli F, Seelaender M (2008) Neural control of the anorexia-cachexia syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab***295**: E1000-1008
- Laviano A, Meguid MM, Inui A, Muscaritoli M, Rossi-Fanelli F (2005) Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself. *Nat Clin Pract Oncol***2**: 158-165
- Mayr NA, Taoka T, Yuh WT, Denning LM, Zhen WK, Paulino AC, Gaston RC, Sorosky JJ, Meeks SL, Walker JL, Mannel RS, Buatti JM (2002) Method and timing of tumor volume measurement for outcome prediction in cervical cancer using magnetic resonance imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys***52**: 14-22
- Miller WL, Auchus RJ (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev***32**: 81-151

- Olah M, Feher P, Ihm Z, Bacskay I, Kiss T, Freeman ME, Nagy GM, Vecsernyes M (2009) Dopamine-regulated adrenocorticotrophic hormone secretion in lactating rats: functional plasticity of melanotropes. *Neuroendocrinology***90**: 391-401
- Pignatelli D, Magalhaes MM, Magalhaes MC (1998) Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm Metab Res***30**: 464-474
- Pignatelli D, Maia M, Castro AR, da Conceicao Magalhaes M, Vivier J, Defaye G (2000) Chronic stress effects on the rat adrenal cortex. *Endocr Res***26**: 537-544
- Prigent H, Maxime V, Annane D (2004) Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. *Crit Care***8**: 243-252
- Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J, Capen CC (2001) Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol***29**: 41-48
- Sripes NdA, Macioszek MA, Bahls LD, Aoki MN, Watanabe MAE, Mazzuco TL (2009) Expressão de genes relacionados à função adrenocortical no estado de caquexia neoplásica- DOI: 10.4025/actascihealthsci.v31i2.6759. *Acta Scientiarum Health Science***31**: 133-141
- Smart JL, Tolle V, Otero-Corchon V, Low MJ (2007) Central dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *Endocrinology***148**: 647-659
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP (2006) Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab***291**: E965-973
- Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH (2006) Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol***38**: 1441-1449