

Caracterização morfológica e fisiológica do eixo adrenocorticotrófico na caquexia neoplásica

Morphophysiological characterization of adrenocorticotropic axis in neoplastic cachexia

*Jefferson Crespigio¹; Rodolfo Andrade Weidmann²; Renata Ramos de Freitas²;
Helenir Medri de Souza³; Tânia Longo Mazzuco^{1,4}*

¹ Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

² Programa de Iniciação Científica, curso de graduação em Medicina, UEL; Londrina, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas/UEL; Londrina, Paraná, Brasil.

⁴ Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde/UEL; Londrina, Paraná, Brasil.

Endereço para correspondência:

Tânia Longo Mazzuco

Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde - UEL

Av. Robert Koch, 60 - Vila Operária, Londrina - PR, Brasil

Caixa postal nº 791, CEP: 86.038-440

Tel. (+55) 43 3371-2234 Fax (+55) 43 3371-2328

e-mail: tmazzuco@uel.br

Resumo

O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) atua na regulação do metabolismo através do estímulo à síntese adrenal de glicocorticóides, hormônios que participam das respostas fisiológicas anti-inflamatórias do organismo, diante de uma agressão ou doença. Nas síndromes consupativas, como a caquexia neoplásica, o eixo corticotrófico é um componente fundamental das respostas neuroendócrinas adaptativas. Com o objetivo de estudar as alterações morfológicas da hipófise e da adrenal em diferentes etapas do desenvolvimento do câncer, foi utilizado o modelo experimental de anorexia-caquexia induzida pelo tumor Walker-256 em ratos Wistar. Cada grupo de animais teve seu peso monitorado, sendo as glândulas removidas, pesadas e submetidas à análise histopatológica. Os resultados demonstram perda de peso acentuada a partir do 5º dia de desenvolvimento tumoral, com índice de caquexia de 12%. Diversas alterações morfológicas como crescimento celular acentuado do córtex da adrenal e aumento de tamanho da hipófise acontecem de forma precoce sendo identificáveis no 5º dia, com poucas diferenças após este momento, incluindo uma pequena regressão das alterações morfológicas iniciais no 12º dia que corresponde ao estado terminal da síndrome de anorexia-caquexia induzida pelo câncer. Hipertrofia e hiperplasia das glândulas adrenais e hipófise são alterações morfológicas resultantes da ativação do eixo corticotrófico em resposta ao stress e acontecem precocemente no desenvolvimento da caquexia neoplásica em ratos portadores de tumor Walker-256.

Palavras-chave: caquexia, câncer, adrenal, hipófise.

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 with Walker-256 cells in rats. Each group of animals was sacrificed at a pre-established period, 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 a cachexia index of 12%. Morphological changes such as cell growth in the adrenal cortex and increase size of the corticotrophic cells in the anterior lobe of the pituitary were also evidenced with few differences after this time, including a small regression on the morphological changes starting at day 12, that corresponds to an advanced stage of the anorexia-cachexia syndrome induced by cancer. The hyperplasia and hypertrophy of the pituitary and adrenal glands are morphological changes resulted from the activation of corticotrophic axis in response to stress and occur early in the development of neoplastic cachexia in Walker-256 tumor bearing rats.

Keywords: cachexia, cancer, adrenal, pituitary.

INTRODUÇÃO

A síndrome da anorexia-caquexia é uma complicação frequente em pacientes portadores de neoplasias malignas em estado avançado. Caracteriza-se por um intenso consumo dos tecidos muscular e adiposo, com conseqüente perda involuntária de peso, além de anemia, astenia, balanço nitrogenado negativo, devido a alterações fisiológicas, metabólicas e imunológicas^(1, 2). Embora a caquexia sempre inclua um componente de redução na ingestão de alimentos, ela difere da ‘semi-inanição’ e da desnutrição por depleção acentuada de tecidos⁽³⁾. Na caquexia a perda de massa corporal pode ocorrer mais rapidamente do que o esperado diante da simples redução da ingestão de alimentos de igual magnitude, e ainda, a perda pode ser maior para o tecido muscular em relação ao adiposo⁽⁴⁾.

O modelo experimental de caquexia induzida pelo tumor de Walker é uma importante ferramenta no estudo das alterações metabólicas e morfológicas que ocorrem em pacientes com câncer. O carcinossarcoma de Walker-256 foi desenvolvido a partir de um carcinoma de origem espontânea na glândula mamária de ratas albinas prenhas, sendo desenvolvida a linhagem celular tumoral LLC-WRC256. Desde então, essas células vêm sendo mantidas em larga escala na sua forma indiferenciada de carcinossarcoma altamente invasivo, sendo utilizadas na pesquisa básica em oncologia⁽⁵⁾.

O córtex da adrenal tem papel fundamental na manutenção do metabolismo energético e no equilíbrio eletrolítico extra-celular, através da secreção de hormônios glicocorticóides (sintetizados principalmente na zona fasciculada da glândula adrenal) e mineralocorticóides (sintetizados na zona glomerulosa)⁽⁶⁾. Sabe-se que em condições patológicas, tais como o câncer, capazes de perturbar a homeostase, ocorre um conjunto de reações de estresse mediadas por citocinas inflamatórias, que estimulam a produção hipotalâmica do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e então ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)⁽⁷⁾. O estímulo ao eixo HPA acarreta em liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipófise, o qual controla tanto a proliferação celular e o trofismo da glândula adrenal, quanto a sua atividade

esteroidogênica. Sua supressão leva à atrofia do córtex da adrenal e seu excesso provoca hiperplasia das zonas reticulada e fasciculada com aumento da vascularização⁽⁸⁾. As adrenais respondem ao aumento de secreção de ACTH induzido pelo estresse produzindo maiores quantidades de glicocorticóides.

Em estudo anterior, utilizando o modelo de caquexia neoplásica induzida pelo tumor de Walker, nós observamos⁽⁹⁾ que ratos com 12 dias de evolução tumoral apresentaram alterações morfológicas da glândula adrenal, tais como hipertrofia e hipervascularização.

Embora estes resultados sugerissem resposta endócrina à agressão, os animais encontravam-se em um estágio avançado do desenvolvimento tumoral com sinais de fadiga, hipoglicemia e hipocolesterolemia⁽¹⁰⁾, incompatíveis com resposta aguda de ativação do eixo HPA. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas do eixo HPA, através da análise morfométrica das glândulas hipófise e adrenal, principais componentes do eixo corticotrófico, em dois momentos importantes do desenvolvimento da síndrome da caquexia induzida pelo tumor Walker-256, isto é, cinco e doze dias de evolução tumoral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos (200 e 250g) para inoculação de células do carcinosarcoma de Walker-256. Os animais foram divididos em dois grandes grupos: “controle” (sem tumor, n=10) e grupo “tumor” (n=20); este último foi subdividido em dois grupos, “tumor D5” e “tumor D12”, marcando o tempo de desenvolvimento tumoral de 5 dias (desenvolvimento de massa tumoral palpável e início dos sinais de anorexia e caquexia) e de 12 dias (crescimento tumoral, índice de caquexia e sinais de fadiga acentuados), de acordo com metodologia e resultados prévios⁽⁹⁾. Os animais foram considerados caquéticos quando apresentaram perda de massa corpórea maior que 10 %, baseada no cálculo do índice de caquexia avaliado pelos parâmetros de massa corpórea inicial e final do rato inoculado com o tumor, massa do tumor e ganho de massa do rato controle. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro Ciências Biológicas, e mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Manutenção das células e desenvolvimento tumoral

O estoque de células tumorais foi mantido por meio de passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de 2×10^6 células/rato. A cada 7 dias, o exsudato peritoneal foi retirado e submetido à centrifugação diferencial a 4°C para separação das células tumorais suspensas em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4 a 4°C. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do corante vital azul tripan seguida de contagem em câmara Neubauer em microscópio óptico.

Para o implante tumoral, os animais receberam anestesia por inalação com éter etílico e uma suspensão de $8,0 \times 10^7$ células injetadas no espaço subcutâneo da pata traseira direita, ou solução de PBS para o grupo controle, sendo acompanhados e pesados diariamente. Ao término dos dias pré-estabelecidos para cada experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo realizada necropsia detalhada, com dissecação, análise macroscópica e pesagem da massa tumoral, da

glândula hipófise e das glândulas adrenais. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de ética em Experimentação Animal (CEEA/UEL43/07).

Estudo histopatológico

As amostras das glândulas hipófise e adrenais foram fixadas por 12-24 horas com formaldeído a 10%, e após esse período processadas em parafina, com cortes histopatológicos de 4,0µm de espessura e coradas posteriormente pela técnica habitual de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas contendo os cortes dos tecidos com a coloração de HE foram avaliadas em microscópio óptico (NIKON E-100) quanto a morfologia e distribuição celular. Para a medida da espessura do córtex da adrenal, utilizaram-se as lâminas de HE, num aumento de 100x, utilizando-se uma régua acoplada a ocular do microscópio, com escala em micrômetros. As lâminas foram fotografadas com uma câmera (CCD – Samsung), acoplada ao microscópio em diferentes aumentos de objetivas.

Análises estatísticas

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 GraphPad Prism 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 nível de significância foi considerado como $p < 5\%$.

RESULTADOS

Após a inoculação das células do tumor de Walker-256 ou solução PBS para o grupo controle, o grupo de animais portadores das células tumorais manteve peso corporal semelhante ao controle até o 4º dia, sendo verificada variação de peso relativa ao grupo controle a partir do dia subsequente (Figura 1), coincidindo com a detecção de nódulo tumoral palpável no sítio de inoculação. No 5º dia após a inoculação das células, os tumores foram identificáveis macroscopicamente; houve aumento da massa tumoral de aproximadamente de 4 vezes no 12º dia (Tabela 1). Ao analisar conjuntamente a massa tumoral e a alteração do peso corpóreo antes e depois do desenvolvimento tumoral, comparativamente ao controle, todos os animais foram considerados caquéticos a partir do 5º dia (Tabela 1).

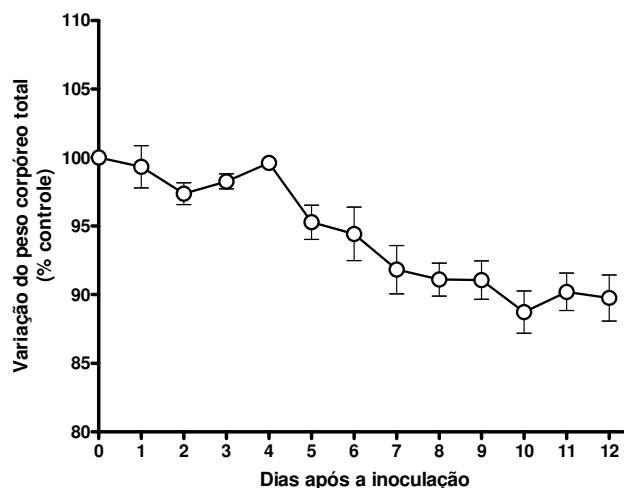


Figura 1. Média da porcentagem de peso corporal diário dos animais portadores de tumor em relação ao peso dos animais do grupo controle.

Os animais do grupo tumor foram estudados em comparação a animais controle, desde o dia da inoculação de células tumorais ou PBS, respectivamente. Ao contrário da variação significativa das medidas ponderais dos animais, os parâmetros morfométricos das adrenais e da hipófise não apresentaram diferença significativa entre os grupos controle aos 5 e 12 dias. Por isso, ambos os grupos foram reunidos sendo que os próximos resultados apresentados se referem ao grupo controle como um todo. Tais parâmetros morfométricos, como o peso total e relativo das glândulas e a espessura do córtex da adrenal, fornecem um indicativo da atividade do eixo HPA.

No 5º e no 12º dias, após o implante tumoral, os pesos absolutos das adrenais foram significativamente maiores do que no grupo controle (Figura 2), sendo 62% e 53% maior que o grupo controle, respectivamente. Entre o 5º e o 12º dias de evolução tumoral, observamos que houve uma tendência à regressão, porém sem significância estatística. Considerando a alteração significativa de peso corporal dos animais (Tabela 1), foram calculados os pesos relativos das adrenais nos grupos controles, com 5 dias e com 12 dias de evolução tumoral, sendo que o mesmo padrão de aumento de tamanho das glândulas foi observado, porém com ganho de peso mais acentuado (111% no dia 5 e 66% no dia 12) (Figura 2). Ao analisar a espessura do córtex, local de síntese de glicocorticóides, foi observada diferença estatisticamente significativa nos grupos portadores de tumor em relação ao grupo controle, sendo que no 5º e no 12º dias houve um aumento da espessura cortical de 34 % e 22 %, respectivamente, em relação ao controle, (Figuras 2 e 3). Não evidenciamos em nosso estudo histológico a presença de metástase tumoral para a glândula adrenal, descartando esta possibilidade como causa para aumento de tamanho da mesma.

Tabela 1. Caracterização da caquexia neoplásica e parâmetros ponderais relacionados, em ratos portadores de tumor no 5º e no 12º dias após a implantação tumoral.

	Dias após o transplante tumoral			ANOVA
	0	5	12	
Peso corporal do animal (g)	218,9 (± 3,1)	217,6 (± 3,8)	271,2 (± 8,3)	p<0,05
Peso do tumor (g)	n.a.	5,22 (±0,48)	22,96 (±1,66)	p<0,05
Índice de caquexia (%)	n.a.	12,0 (± 0,7)	14,7 (± 0,9)	p<0,05

Os valores estão expressos pela média± erro padrão

n.a: não se aplica

Foram também utilizados parâmetros morfométricos para avaliar a contribuição hipofisária na resposta da adrenal, durante a caquexia neoplásica. No 5º e no 12º dias, após o implante tumoral, os pesos absolutos da hipófise foram superiores ao grupo controle em 55% e 47%, respectivamente (Figura 4). Em concordância com estes resultados, a média de peso da hipófise normalizada para o peso de cada animal foi menor para os animais do grupo controle. Houve ganho de 95% e 58% de peso após 5 e 12 dias de evolução tumoral (Figura 4). A alteração morfológica representada pelo aumento de peso da hipófise é a hipertrofia da glândula. Do 5º para o 12º dias de evolução tumoral, observamos a mesma tendência à recuperação do peso com valores mais próximos do peso inicial da glândula, antes da inoculação tumoral (Figura 4), como encontrado na análise precedente das glândulas adrenais.

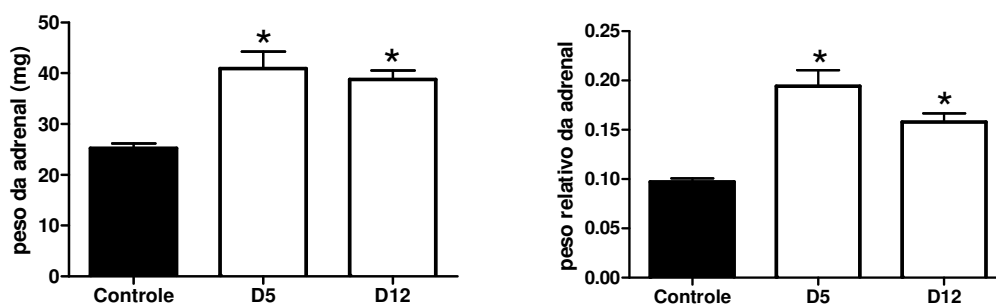


Figura 2. Peso absoluto e peso relativo da adrenal em relação ao peso corporal do animal nos três grupos analisados (sendo D5 e D12, ratos portadores de tumor no 5º e 12º dias de evolução). Valores expressos em média±EPM, sendo n=10 para grupo controle e n=10 em cada grupo com tumor. *p<0,01 em relação ao controle (ANOVA, pós teste de Tukey).

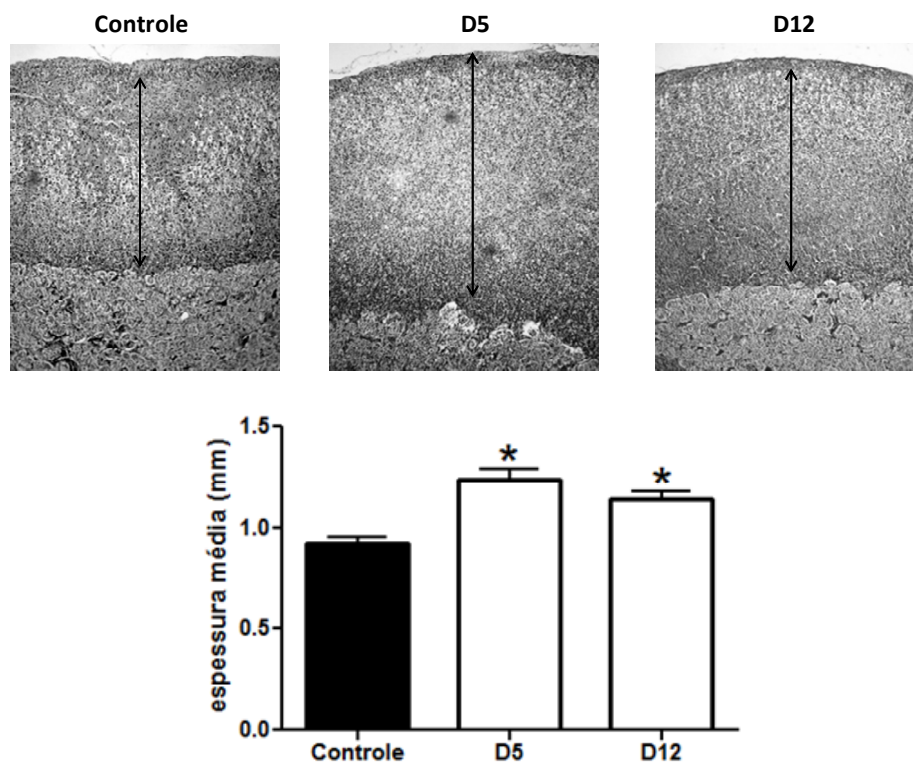


Figura 3. Imagens representativas da adrenal com exemplos da fotomicroscopia utilizada para aferição da espessura do córtex (indicada pelas setas) nos três grupos estudados (sendo D5 e D12, ratos portadores de tumor no 5º e 12º dias de evolução). Coloração HE, 10X ao microscópio óptico. Média \pm EPM da espessura do córtex, * $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA, pós teste de Tukey).

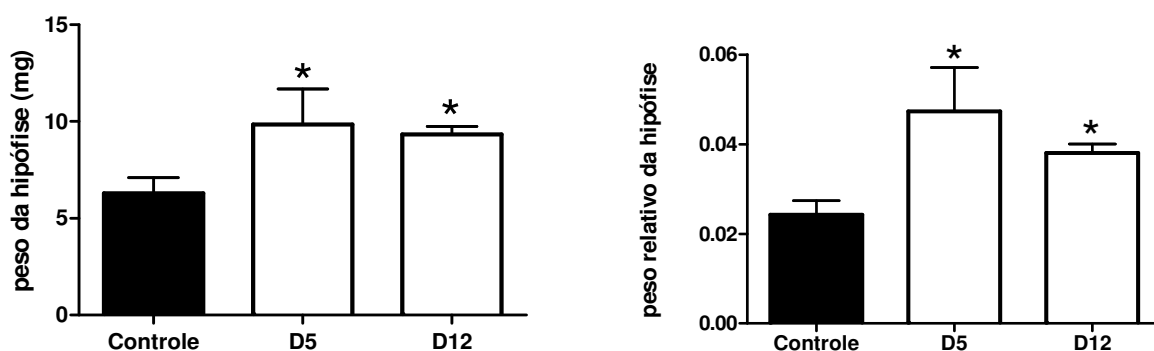


Figura 4. Média do peso absoluto e do peso relativo da hipófise em relação ao peso do animal nos três grupos analisados. Valores expressos em média \pm EPM, sendo $n=10$ para grupo controle e $n=10$ em cada grupo com tumor. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA, pós teste de Tukey).

DISCUSSÃO

A perda da massa corpórea observada nos animais portadores de tumor de Walker caracteriza a síndrome de anorexia-caquexia, intensificada pelas alterações conhecidas no metabolismo dos nutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios), alterações hormonais (leptina, NPY, MC, grelina), além do aumento das citocinas circulantes (TNF α , IL-1, IL-6, IFN) (11). Mudanças na percepção de paladar e olfato ocorridas com a progressão tumoral também contribuem com a anorexia na prática clínica^(12, 13). Por outro lado, já foi demonstrado neste modelo experimental de tumor de Walker que a reduzida ingesta alimentar não é a causa das alterações metabólicas relacionadas à caquexia⁽¹⁾. Além disso, em estudo prévio do nosso grupo as medidas da glândula adrenal no estágio final da caquexia não foram influenciadas pela perda de peso quando comparadas com o grupo *pair fed*⁽⁹⁾.

Em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa⁽⁹⁾, utilizando o mesmo modelo de caquexia neoplásica, evidenciamos que a glândula adrenal apresentou comprometimento morfológico relacionado à resposta ao stress, em ratos sacrificados com 12 dias de evolução tumoral, com padrão histopatológico sugestivo de maior secreção de catecolaminas além de hipertrofia cortical. No presente estudo, observamos que as alterações morfológicas das glândulas adrenais ocorreram precocemente no desenvolvimento da caquexia neoplásica, até mesmo antes do 5º dia de evolução tumoral (resultado não apresentado).

O maior peso das adrenais nos animais com tumor sugere hipertrofia adrenal como consequência da resposta funcional da glândula no decorrer do desenvolvimento tumoral, especialmente na primeira parte quando se inicia o quadro de caquexia (D5). Tal hipertrofia ocorreu às custas de um aumento da área do córtex adrenal, visto que a espessura do mesmo encontrava-se aumentada nos animais portadores de tumor. Considerando o papel fundamental da glândula adrenal na manutenção da homeostasia, alterações em sua morfologia, especialmente na camada cortical, indicam modulação do eixo HPA. No córtex adrenal, ocupando dois terços da sua espessura, encontra-se a zona fasciculada, sendo composta por cordões de células ricas em lipídios. A camada fasciculada é o principal local da síntese do cortisol nos humanos e da corticosterona nos murinos⁽¹⁴⁾. O aumento do peso das glândulas adrenais está relacionado à hiperplasia e hipertrofia glandular que ocorre principalmente em células da camada fasciculada, conforme observamos na análise histológica com a coloração HE (Figura 3). Já foi relatado que este tipo de alteração está associado à maior secreção de corticosterona em resposta ao ACTH hipofisário na resposta de estresse crônico em ratos^(15, 16).

A hipófise controla o trofismo e a atividade esteroidogênica do córtex da glândula adrenal através da produção de ACTH. No lobo anterior da adeno-hipófise encontram-se as células corticotróficas que são basófilas, poligonais, com núcleos esféricos e periféricos, que produzem pro-opiomelanocortina (POMC) e seus derivados incluindo 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, sendo o principal componente no lobo intermediário, pouco desenvolvido em humanos, mas importante fonte de melanotropina em murinos⁽¹⁷⁾. A variação de peso da glândula hipófise pode ocorrer devido a alterações na quantidade ou tamanho de células corticotróficas, ou ainda por alteração global na celularidade da mesma. A análise histológica realizada não permitiu identificar diferenças no conteúdo de células basófilas das hipófises de animais D5 e D12 em relação ao controle.

Em processos patológicos como no câncer, há estímulo constante do eixo HPA, devido à presença de substâncias produzidas pelo tumor ou à resposta inflamatória do organismo, levando à produção prolongada do ACTH e caracterizando assim um estado de estresse crônico⁽⁷⁾. Neste modelo estudado de tumor de Walker, logo no início do estabelecimento da síndrome de anorexia-caquexia (5º dia) já existem alterações significativas nos parâmetros morfométricos das glândulas do eixo HPA, sugerindo produção prolongada do ACTH com aumento da glândula hipófise e, como consequência, hipertrofia na camada cortical da glândula adrenal. Tais alterações ocorreram antes do 5º dia e são compatíveis com dados da literatura em que a administração de ACTH em ratos leva ao aumento o tamanho das adrenais a partir de 24 horas da injeção (18). No presente estudo, as alterações nas glândulas do eixo HPA foram menos evidentes no final do processo de caquexia (12º dia).

Com o desenvolvimento da caquexia neoplásica, decorrente da evolução tumoral no modelo experimental do tumor de Walker, observamos uma dupla resposta morfológica do eixo corticotrófico. Uma resposta inicial foi caracterizada por aumento no tamanho das glândulas hipófise e adrenal, e hiperplasia predominantemente das células da zona fasciculada do córtex adrenal. A presença destas alterações revela que mecanismos moleculares e respostas hormonais iniciaram antes do 5º dia de evolução tumoral, ou seja, antes da formação de uma massa tumoral palpável e antes da instalação do quadro de anorexia-caquexia. No 12º dia após a inoculação das células tumorais, momento em que o animal tem uma pequena sobrevida devido ao quadro avançado de anorexia-caquexia, submetido a estresse contínuo, o estudo das glândulas hipófise e adrenal evidenciou uma tendência à regressão dos parâmetros morfométricos. Estudos mais aprofundados poderão revelar o status funcional das glândulas adrenal e hipófise a fim de elucidar se as alterações morfológicas observadas são causa ou consequência da caquexia neoplásica.

Agradecimentos

Apoio financeiro através de bolsas de iniciação científica aos seguintes autores deste trabalho R.A.W. (PIBIC/CNPq) e R.R.F. (IC/Fundação Araucária). Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão FAEPE/UEL pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cassolla P, Moreira CC, Liboni TF, Zaia CT, Borba-Murad GR, Bazotte RB, et al. 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*. 2012 Jun;30(4):265-70.

2. Pinge MCM, Mastelari RB, da Silva IFS, Mehanna A, de Abreu SB, Blanco EEA, et al. Alterações promovidas pelo treinamento físico no edema pulmonar e perda de massa muscular em ratos portadores de tumor Walker-256. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2008;29(2):163-70.
3. Koehnlein EA, Salado GA, Yamada AN, Silva AA. Avaliação do estado nutricional de pacientes em diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC)-DOI: 10.4025/actascihealthsci. v31i1. 545. *Acta Scientiarum Health Science*. 2009;31(1):57-63.
4. Emery PW. Cachexia in experimental models. *Nutrition*. 1999 Jul-Aug;15(7-8):600-3.
5. Corbello Pereira SR, Darronqui E, Constantin J, da Silva MH, Yamamoto NS, Bracht A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Apr 5;1688(3):187-96.
6. Pignatelli D, Magalhaes MM, Magalhaes MC. Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm Metab Res*. 1998 Jun-Jul;30(6-7):464-74.
7. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995 May 18;332(20):1351-62.
8. Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ. Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology*. 2004 Sep;145(9):4320-9.
9. Fonseca EAI, Macioszek MA, Saito AY, Cotrim KG, Mazzuco TL. Estudo das alterações morfológicas da glândula adrenal na caquexia neoplásica. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2009;30(2):163-74.
10. Macioszek MA. Estudo do sistema neuroendócrino na caquexia neoplásica e da resposta ao tratamento com esteróides [Dissertação de mestrado]: Universidade Estadual de Londrina; 2008.
11. Laviano A, Inui A, Marks DL, Meguid MM, Pichard C, Rossi Fanelli F, et al. Neural control of the anorexia-cachexia syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Nov;295(5):E1000-8.
12. Davis MP, Dreicer R, Walsh D, Lagman R, LeGrand SB. Appetite and cancer-associated anorexia: a review. *J Clin Oncol*. 2004 Apr 15;22(8):1510-7.
13. Del Fabbro E, Dalal S, Bruera E. Symptom control in palliative care--Part II: cachexia/anorexia and fatigue. *J Palliat Med*. 2006 Apr;9(2):409-21.
14. Mazzuco TL, Herrera ACSA, Fonseca EAI. Interesse do Estudo dos Tumores Adrenocorticais em Patologia Experimental e Clínica. In: Watanabe MAE, M.A. Ono MA, editors. *Tópicos em Patologia Experimental*. Londrina (PR), Brasil: EDUEL - Universidade Estadual de Londrina; 2008.

15. Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Nov;291(5):E965-73.
16. Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Richtand NM, Herman JP. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology.* 2006 Apr;147(4):2008-17.
17. Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH. Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(9):1441-9.
18. Ferreira JG, Cruz CD, Neves D, Pignatelli D. Increased extracellular signal regulated kinases phosphorylation in the adrenal gland in response to chronic ACTH treatment. *J Endocrinol.* 2007 Mar;192(3):647-58.