

# Expressão de genes relacionados à função adrenocortical no estado de caquexia neoplásica

Nicole de Angelis Sripes, Marcelo Abbá Macioszek, Larissa Danielle Bahls, Mateus Nóbrega Aoki, Maria Angelica Ehara Watanabe e Tânia Longo Mazzuco\*

Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: tmazzuco@gmail.com

**RESUMO.** A glândula adrenal tem papel fundamental na resposta neuroendócrina, especialmente em situações em que há comprometimento da homeostasia. No processo de caquexia neoplásica, há prejuízo da homeostasia por alterações nutricionais e metabólicas do câncer em estágio avançado, envolvendo a resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Neste trabalho, foi utilizado um modelo animal de caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 em ratos Wistar. Os animais (n=4) foram sacrificados dez dias após a inoculação de células tumorais e a glândula adrenal foi removida. O RNA foi extraído para o estudo da expressão de genes relacionados ao controle da esteroidogênese por RT-PCR semiquantitativa. A análise dos dados demonstrou expressão significativamente reduzida dos genes MC2R (receptor tipo 2 para melancortina), 3 $\beta$ HSD I (3 $\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase tipo I) e TSPO (proteína translocadora) em animais com caquexia neoplásica (valores de P=0,037; 0,0097 e 0,052, respectivamente), revelando falência do córtex da adrenal.

**Palavras-chave:** glândulas adrenais, caquexia, receptores da corticotropina, 3-hidroxiesteroide desidrogenases, proteína translocadora, proteína aguda reguladora da esteroidogênese.

**ABSTRACT.** **Expression of genes related to the adrenocortical function in the neoplastic cachexia process.** The adrenal gland plays a crucial role in the neuroendocrine response, especially in situations where homeostasis is disturbed. In the neoplastic cachexia process, there is homeostasis impairment by nutritional and metabolic alterations of advanced-stage cancer, involving hypothalamus-pituitary-adrenal axis response. In this assignment, an experimental model of cachexia induced by Walker-256 tumor was performed in Wistar rats. Animals (n=4) were sacrificed 10 days after inoculation of tumor cells, and the adrenal glands were excised. The RNA was isolated for the study of gene expression related to the steroidogenesis control by semi-quantitative RT-PCR. Data analysis showed a significant reduced expression of MC2R (melancortin type 2 receptor), 3 $\beta$ HSD I (3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I) and TSPO (translocator protein) genes in animals with neoplastic cachexia (P=0.037, 0.0097 and 0.052, respectively), revealing adrenal cortex failure.

**Key words:** adrenal glands, cachexia, corticotropin receptors, 3-hydroxysteroid dehydrogenases, translocator protein, steroidogenic acute regulatory protein.

## Introdução

A caquexia é uma síndrome multifatorial que resulta de várias anormalidades do metabolismo, caracterizada pela dramática perda de tecido muscular e tecido adiposo, acompanhada de profunda fraqueza, anorexia e anemia (TISDALE, 2001; FEARON; MOSES, 2002). Embora a caquexia sempre inclua um componente de redução na ingestão de alimentos, ela difere da 'semi-inanição' e da desnutrição por depleção (KOEHNLEIN et al., 2009), pelo fato de que há também alterações metabólicas e mediadores

inflamatórios envolvidos. Isto significa que 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 não-gorduroso em relação ao adiposo (EMERY, 1999).

Tal síndrome ocorre em processos fisiopatológicos crônicos incluindo câncer, AIDS, diabetes mellitus severo e artrite reumatóide. Na caquexia neoplásica, causada por neoplasia em estágio avançado, a ativação de mecanismos de defesa e a interação entre eles envolvem mediadores

químicos produzidos por estes processos patológicos, pelo tumor e pelo hospedeiro, como hormônios peptídicos, neurotransmissores e citocinas (TISDALE, 2001).

O modelo experimental de caquexia em ratos induzida pelo tumor de Walker, é amplamente utilizado para a compreensão desta síndrome, a caquexia neoplásica. 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-WRC 256. Desde então, essas células vêm sendo mantidas em larga escala na sua forma indiferenciada de carcinossarcoma altamente invasivo, sendo importante recurso na pesquisa básica em oncologia (TAYEK et al., 1986; PEREIRA et al., 2004). Diversos aspectos referentes ao seu comportamento biológico, sua capacidade de induzir rapidamente um estado de caquexia neoplásica e suas alterações bioquímicas vêm sendo estudados, visto que esta é uma importante causa de mortalidade no câncer, sendo a desnutrição muito prevalente em pacientes oncológicos, associada à diminuição da resposta ao tratamento e qualidade de vida (SILVA, 2006).

O sistema hipotálamo-hipófise-adrenal, conhecido como eixo HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal), é componente fundamental nas respostas neuroendócrinas e imunes aos diversos processos patológicos caracterizados pelo comprometimento da homeostasia gerados pelo estresse (REICHE et al., 2005). As glândulas adrenais são órgãos endócrinos pares, situados nos pólos superiores dos rins, divididas em duas regiões distintas, o córtex e a medula. O córtex está subdividido em três regiões: zona glomerular, fasciculada e reticular que são responsáveis pela produção, respectivamente, de mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais. A medula adrenal, porção central da glândula, é composta por células cromafins, as quais sintetizam e secretam catecolaminas, especialmente adrenalina (MAZZUCO et al., 2008). De um modo geral, a glândula adrenal participa de duas maneiras na resposta aguda ao estresse: 1) resposta medular com secreção de adrenalina e noradrenalina sob influência do sistema nervoso autônomo; 2) resposta cortical com secreção de glicocorticoides sob influência do eixo HPA e da própria produção medular (parácrina) de catecolaminas (CHIKANZA; GROSSMAN, 2000).

O controle do eixo HPA é feito principalmente por intermédio do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) secretado pelos neurônios dos núcleos para-

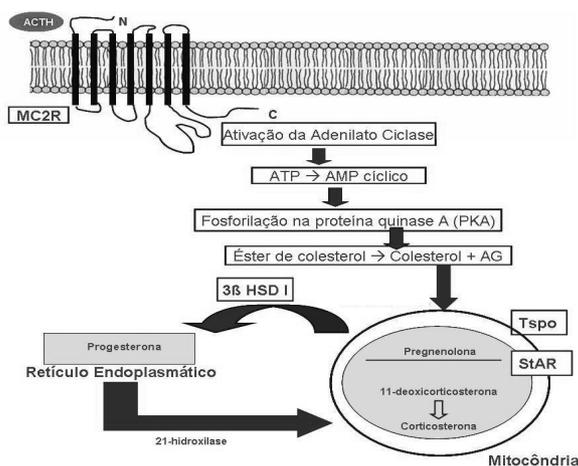
ventriculares do hipotálamo, pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na glândula hipófise e outros mecanismos como ritmo circadiano e estresse, assim como o retrocontrole negativo exercido pelos glicocorticoides exógenos ou endógenos (STEWART, 2003). O órgão-alvo do eixo HPA é a glândula adrenal, cuja camada cortical contém uma série de enzimas que formam a cascata da esteroidogênese (Figura 1). No córtex adrenal, o ACTH liga-se ao seu receptor MC2R (receptor tipo 2 para melancortina ou receptores da corticotropina.) que desencadeia uma série de reações necessárias para esteroidogênese, dependentes da ativação da enzima adenilato ciclase que leva à produção de AMP cíclico. Este é o segundo mensageiro mais importante na ação do ACTH, que promove diversos eventos celulares: aumento do número de receptores para LDL, transporte do colesterol para mitocôndria, fosforilação de proteínas via proteína quinase A (PKA), síntese de DNA, transcrição de RNAm e síntese proteica, e de suma importância, a ativação da cascata de enzimas da esteroidogênese (CLARK et al., 2003).

O ACTH, então, controla tanto a proliferação celular e o trofismo da glândula, quanto a atividade esteroidogênica. Sua supressão leva à atrofia do córtex adrenal e, inversamente, seu excesso provoca hiperplasia das zonas reticulada e fasciculada. Este hormônio é reconhecido pelo seu receptor localizado na adrenal, o MC2R (IDELMAN; VERDETTI, 2000). Essa classe de receptores tem seis isoformas que são: MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R e o MC6R, porém somente o MC2R é expresso na glândula adrenal (FLÜCK; MILLER, 2008).

Além disso, a enzima 3-beta-hidroxiesteroide-desidrogenase, tipo I (3 $\beta$ HSD I), é fundamental na progressão da cascata enzimática de síntese do cortisol, tendo cinco isoformas altamente homólogas, porém com atividade enzimática e expressão tecidual diferentes. Assim, a 3 $\beta$ HSD I é uma desidrogenase/isomerase expressa nas gônadas e na adrenal, 3 $\beta$ HSD II e III são expressas no fígado e rins e 3 $\beta$ HSD IV e V nos rins (ABBASZADE et al., 1995).

Cofatores como StAR (proteína aguda reguladora da esteroidogênese) e TSPO (proteína translocadora), que até recentemente era denominada de PBR (receptor benzodiazepínico periférico), são responsáveis pelo transporte de colesterol para dentro da mitocôndria (RAFF et al., 2003). TSPO é uma proteína que limita a etapa da esteroidogênese relacionada ao transporte do colesterol, assim como StAR, porém sua expressão parece estar mais envolvida com a estimulação

crônica pelo ACTH (RAFF et al., 2003; LEE et al., 2004).



**Figura 1.** Representação esquemática das principais etapas da cascata da esteroidogênese. O ACTH se liga ao seu receptor MC2R com sete domínios transmembranas acoplados à proteína Gs, cuja subunidade alfa ativa a adenilato ciclase que converte ATP em AMP cíclico, o qual faz a fosforilação da proteína quinase A (PKA) ativando a enzima colesterol esterase que gera colesterol e ácidos graxos (AG). O colesterol então é transportado do citoplasma para mitocôndria com auxílio dos cofatores Tspo e StAR, nesta ordem. Em seguida, dentro da mitocôndria ocorre a conversão em pregnenolona pela enzima desmolase. No retículo endoplasmático, a enzima 3βHSD I forma progesterona, que, na mitocôndria, é convertida a 11-deoxicorticosterona e depois a corticosterona, que é então secretada pelas células do córtex da adrenal para a circulação sanguínea. Algumas etapas da cascata enzimática foram omitidas para se facilitar a compreensão.

Considerando o papel da glândula adrenal no eixo HPA, cujas respostas no estado de caquexia neoplásica ainda não estão claramente elucidadas, o objetivo desse trabalho foi estudar a expressão de genes relacionados à função adrenocortical, adotando o modelo experimental de caquexia induzida pelo tumor sólido Walker-256.

## Material e métodos

### Animais

Foram utilizados oito ratos Wistar machos adultos (200 a 300 g), mantidos a 24°C em ciclo luz-escuro de 12h e com acesso à água e a alimento *ad libitum*. Em relação à presença de células tumorais, os animais foram divididos em dois grandes grupos: 'controle' (sem tumor) e grupo 'tumor'. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (nº CEEA/Uel - 43/07).

### Manutenção das células tumorais *in vivo*

Foi utilizada a linhagem celular de carcinossarcoma de Walker-256 (LLC-WRC 256),

mantida em passagens semanais por inoculação asséptica intraperitoneal de  $2 \times 10^6$  células animal<sup>-1</sup>. A cada sete dias, o exsudato peritoneal foi retirado e submetido à centrifugação a 4°C para obtenção das células tumorais. As células foram suspensas em tampão (PBS) pH 7,4 gelado e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do corante vital azul de tripan com contagem em câmara de Neubauer.

Na véspera da inoculação tumoral, os animais de ambos os grupos foram tratados com uma dose imunossupressora de acetato de dexametasona (1 mg kg<sup>-1</sup> via oral, por dois dias, com o objetivo de se evitar rejeição tumoral no grupo 'tumor'. No dia 'zero', os animais foram previamente anestesiados pela administração intraperitoneal de xilazina (3 mg kg<sup>-1</sup>) associada com ketamina (90 mg kg<sup>-1</sup>) e uma suspensão de  $8,0 \times 10^7$  células em 0,5 mL foi injetada, utilizando-se seringa de 1,0 mL e agulha 30 G, no espaço subcutâneo da região posterior do flanco direito. Os animais do Grupo-controle receberam uma injeção do mesmo volume, com apenas PBS. Foram construídas curvas de evolução do peso do animal e do crescimento tumoral. Foi utilizada a fórmula largura x comprimento x profundidade x 0,52333 (fator para estruturas elipsoides) (COCHAND-PRIOLETT et al., 2003).

### Índice de perda de massa corpórea

Para o cálculo da alteração ponderal da massa corpórea dos animais, foi utilizada a seguinte fórmula: % perda de massa corpórea =  $(mie - mfe + mt + gmc) \times 100 / (mie + gmc)$ , em que: mie = massa corpórea inicial do rato; mfe = massa corpórea final do rato inoculado com o tumor; mt = massa do tumor e gmc = ganho de massa do rato-controle. Os animais foram considerados caquéticos quando apresentaram perda de massa corpórea maior que 10%.

### Obtenção de amostras

Os animais foram sacrificados por decapitação sob anestesia geral prévia com a associação de xilazina e ketamina, descrita anteriormente. A glândula adrenal foi removida, utilizando-se material estéril para excisão da mesma, sendo transferida para microtubo livre de DNase e RNase em solução de lise e conservação de RNA (TRIzol - Invitrogen *Life Technologies*), armazenado a -20°C.

### Extração de RNA total

Para cada grupo de animais, o tecido adrenal foi homogeneizado em solução de TRIzol e mantido à

temperatura ambiente por 5 min. Foram realizadas as etapas de extração de acordo com as instruções do fabricante, pela utilização de clorofórmio, remoção da fase aquosa e adição de álcool isopropílico. Os precipitados foram ressuspensos em água (50 µL para cada 100 mg de tecido) livre de RNAses e o RNA total foi armazenado a -80°C.

### Reação de transcrição reversa

Para a síntese do DNAc (DNA complementar), foi realizada a reação de transcrição reversa (RT), utilizando-se a enzima M-MLV RT (Invitrogen *Life Technologies*) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, que incluiu a incubação das amostras de 500 ng RNA total, (ou RNA molde) a 37°C por 50 min. com tampão RT Buffer 5x (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA), ditioneitol, dNTPs (trifosfato de desoxirribonucleotídeos), iniciador Oligo dT e inibidor de RNase, para um volume final de 20 µL. A reação foi inativada a 70°C por 15 min. O DNAc resultante foi armazenado a 4°C.

As reações para os diferentes genes de interesse foram realizadas separadamente. A concentração de DNAc das amostras sintetizadas foi quantificada por espectrofotometria (leitura em A260) a fim de se utilizar 1 µg para cada reação de PCR, e a pureza das amostras foi examinada pela relação A260/A280, sendo A280 a dosagem de proteína na solução.

### RT-PCR semiquantitativa

As sequências de RNA mensageiro (RNAm) dos genes de interesse foram obtidas através das bases de dados NCBI e Ensembl (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação dos genes de interesse para estabelecimento dos primers, incluindo a localização genômica e o tamanho do transcrito.

Gene	Números de acesso <sup>1</sup>		Nº de éxons	Tamanho do RNAm	Cromossomo
	NCBI	Ensembl			
MC2R	XM_001067549	ENSRNOG00000016681	1	929 pb	18
3βHSD I	NM_001007719	ENSRNOG00000019454	4	1640 pb	2
StAR	NM_031558	ENSRNOG00000015052	7	1155 pb	16
TSPO	NM_012515	ENSRNOG00000010549	3	781 pb	7
GAPDH	NM_017008	ENSRNOG00000018630	9	1307 pb	4

Abreviações: MC2R (receptor tipo 2 para melancortina), 3βHSD I (3-beta-hidroxiesteroide-desidrogenase tipo I), StAR (proteína aguda reguladora da esteroidogênese) e TSPO (proteína translocadora).

As sequências dos oligonucleotídeos foram obtidas da literatura ou desenhadas por meio do software EMBOSS, versão 2.10.0 Win 0.8, (Tabela 2) e checadas pela PCR virtual (UCSC In-Silico PCR) disponível no site <http://hgw4.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>.

<sup>1</sup> Base de dados utilizadas: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Ensembl ([http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus)).

**Tabela 2.** Lista de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) usados para análise das adrenais.

Genes	Produto de PCR (pb)	Sequência 5' → 3'	T.A.	Fonte
MC2R	150	S - TGATCTTCTCCCACCATATCC AS - TCATGTTGGCTCTAGGAAGG	53°C	(SALZMANN et al., 2004)
3βHSD I	264	S - TCACATGTCTACCCAGG AS - ATTTTCAGGATGCTCCC	51,8°C	(AKINGBEMI et al., 2004)
StAR	389	S - TTGGGCATACTCAACAACCA AS - ATGACACCGCTTTGCTCAG	53,0°C	(AKINGBEMI et al., 2004)
TSPO	198	S - GCTATGGTTCCCTTGGGTCT AS - CCAGGCCAGGTAAGGATACA	53,5°C	EMBOSS <sup>2</sup>
GAPDH	493	S - ATGGTGAAGGTCGGTGAACG AS - GTTGTATGGATGACCTTGGCC	55°C	(OKAMOTO et al., 1996)

Abreviações: pb=pares de base, T.A.= temperatura de anelamento, S= sense, AS= antissense, MC2R (receptor tipo 2 para melancortina), 3βHSD I (3-beta-hidroxiesteroide-desidrogenase tipo I), StAR (proteína aguda reguladora da esteroidogênese) e TSPO (proteína translocadora).

Todas as reações de amplificação foram realizadas utilizando-se a enzima TaqDNA polimerase (Invitrogen *Life Technologies*), com tampão Buffer 10X, dNTPs, oligonucleotídeos iniciadores específicos sense e antissense (*primers* – sense e antissense), além do DNAc molde, em termociclador *PCR Sprint ThermoHybaid* (Biosystems), conforme as orientações do fabricante. Foram usados entre 30-35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s; o anelamento ocorreu na temperatura ideal para cada *primer* (Tabela 2) por 45 s e extensão a 72°C por 1 min. e 30 s para um volume final de 25 µL.

### Análise dos fragmentos amplificados de DNAc

Os amplicons foram aplicados em gel de acrilamida a 10% e foram submetidos à eletroforese em minicuba vertical a 70 V por 90 min., em tampão de corrida TAE 1X. Em seguida, os fragmentos amplificados foram visualizados por coloração de nitrato de prata, fotodocumentados e digitalizados. A densitometria das bandas eletroforéticas foi calculada, utilizando-se o programa ImageJ 1,40 g (NIH).

### 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 utilizados os programas Microsoft Office Excel 2003 e GraphPad Prism 4.02. A hipótese de igualdade de médias entre dois grupos foi verificada por meio do teste 't' de Student e entre quatro grupos por meio de análise de variância (ANOVA). O nível de significância foi considerado como < 5%. Foi utilizado um n de quatro animais em cada grupo.

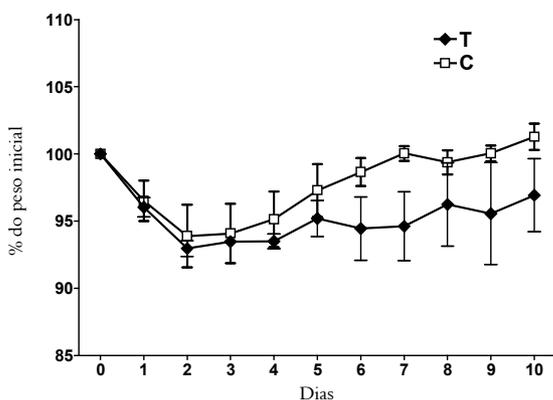
### Resultados e discussão

Os genes selecionados no presente trabalho (MC2R, 3βHSD I, StAR e TSPO) participam do controle da cascata da esteroidogênese e sua análise

<sup>2</sup> Primers desenhados através do programa EMBOSS (<http://emboss.sourceforge.net/>).

fornece um indicativo do padrão de resposta funcional do córtex da glândula adrenal e o controle da mesma pelo hormônio adrenocorticotrófico. O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) tem expressão constitutiva e foi utilizado como controle interno.

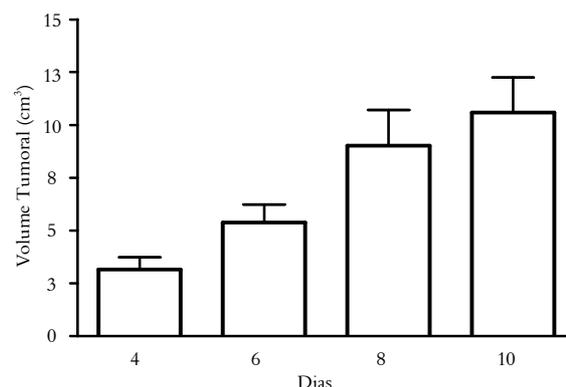
Inicialmente, o seguimento do peso dos animais e do crescimento tumoral (Figura 2) demonstraram que o Grupo-controle (C) teve um peso final de  $101,27 \pm 1,95\%$ , enquanto que o Grupo-tumor (T) obteve peso final de  $96,93 \pm 5,46\%$ . Em relação à perda de massa corpórea, os animais do Grupo-tumor obtiveram um índice de  $13,58 \pm 3,87\%$ , sendo então considerados caquéticos. No quinto dia após inoculação das células, os tumores foram identificáveis macroscopicamente e, ao final de dez dias, possuíam massa de 3 a 25 g. Em relação à curva de peso relativo (Figura 2), nota-se que os animais portadores de tumor não apresentaram ganho de peso a partir do quinto dia, correlacionando-se ao crescimento tumoral com desenvolvimento de caquexia.



**Figura 2.** Evolução do peso dos animais dos Grupos controle (C) e tumor (T), relativa ao peso no dia da inoculação tumoral. Teste 't' de student,  $p < 0,05$  (comparação entre a variação de peso de cada grupo).

A perda de peso e de massa corpórea caracteriza o estado de caquexia, que pode ser mediado por um aumento dos níveis de glicocorticoides endógenos e citocinas inflamatórias (interleucinas,  $IFN-\gamma$  e  $TNF-\alpha$ ), desencadeadas pela agressão representada pelo crescimento da massa tumoral. Em pacientes caquéticos com câncer, comparados àqueles sem caquexia, estas alterações têm potencial para estimular a proteólise muscular, a lipólise do tecido adiposo e o aumento da mobilização de gordura, a gliconeogênese hepática e a resistência periférica à glicose (RIVADENEIRA et al., 1999; RUSSELL; TISDALE, 2005).

O tamanho do tumor dos animais do Grupo T também foi avaliado durante os dias de experimento e constatou-se que o volume tumoral aumentou significativamente (Figura 3). O desenvolvimento tumoral foi proporcional ao grau de caquexia neste modelo (dados não-apresentados). Sabe-se que o desenvolvimento e a progressão das neoplasias malignas induz à produção de quimiocinas e outras citocinas que, por sua vez, interagem com células imunes e inflamatórias (SUZUKI et al., 2008). Além disso, em condições patológicas como o câncer, existe uma resposta aguda do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal, mediada por citocinas inflamatórias relacionadas à implantação e ao desenvolvimento tumoral (BOSSOLA et al., 2007). Esses mediadores são capazes de estimular a produção hipotalâmica do CRH e então ativar o eixo HPA, aumentando a liberação do ACTH pela glândula hipófise. Assim, a responsividade do eixo HPA pode trazer repercussões sobre: a) o estado geral e neurovegetativo; b) a regulação entre o consumo de alimento, o apetite e o gasto energético; c) a resposta antitumoral do hospedeiro, incluindo o fenótipo e o número de linfócitos (principal componente do infiltrado mononuclear em tumores sólidos); d) a resposta anti-inflamatória do organismo (ZALOGA, 2001; REICHE et al., 2005).



**Figura 3.** Evolução do volume tumoral em ratos portadores de tumor sólido de Walker. ANOVA,  $p < 0,001$ .

Entretanto, um único estudo demonstrou, ao longo da evolução tumoral, diminuição progressiva dos níveis sanguíneos de corticosterona e de ACTH em ratos portadores de tumor, indicando redução da função adrenal e hipofisária (ZEPP; GRAY, 1983), ao invés de hiperfunção adrenal como resposta de estresse. Diante dos argumentos apresentados, a próxima etapa deste trabalho foi estudar a atividade do

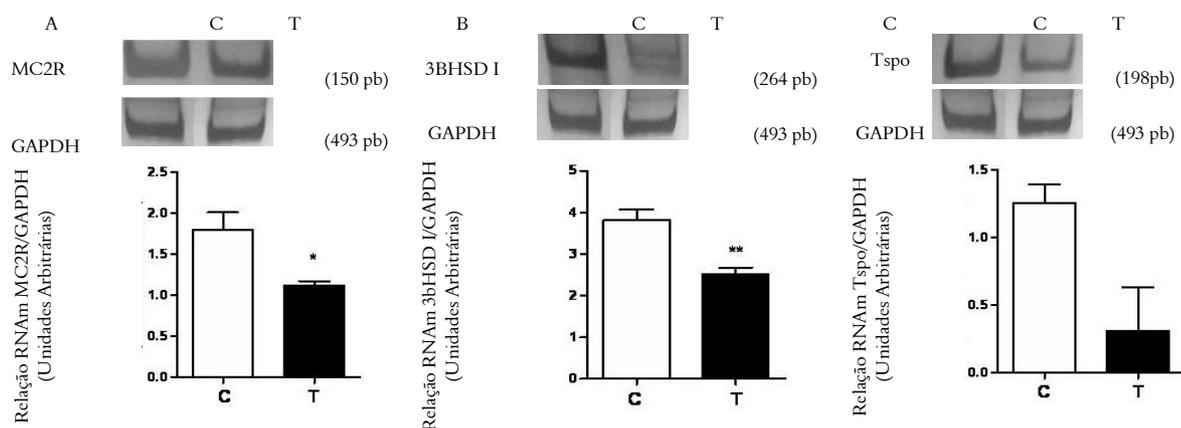
córtex adrenal por meio do estudo da expressão de genes MC2R, 3 $\beta$ HSD I, StAR e TSPO em glândulas adrenais de animais-controle e portadores de tumor Walker-256 com caquexia avançada, sacrificados no décimo dia após inoculação tumoral.

A análise de densitometria das bandas dos produtos de RT-PCR (Figura 4A) demonstrou redução significativa da expressão dos transcritos para MC2R no Grupo-tumor em relação ao controle. Este gene codifica um receptor acoplado à proteína G, expresso no córtex adrenal, que é ativado pela ligação do ACTH hipofisário, desencadeando uma série de reações relacionadas ao AMP cíclico que vão levar ao aumento de colesterol livre, precursor dos hormônios esteroides, além de ativação da transcrição de fatores esteroidogênicos. Portanto, o MC2R tem papel fundamental na atividade da glândula adrenal (CHIDA et al., 2007) e sua expressão reduzida leva à diminuição da função adrenal. Apesar de nosso trabalho não apresentar dados referentes à produção de ACTH ou à expressão de genes hipofisários, a expressão reduzida de MC2R adrenal indica redução no estímulo deste receptor. Tal hipótese é sustentada pelo fato de que o receptor para o ACTH (MC2R), contrariamente a outros receptores acoplados à proteína G, não está sujeito ao mecanismo habitual de dessensibilização de receptores no tecido-alvo no caso de excesso de ligante, nem o inverso, ou seja, aumento de receptores diante da falta de ligante (LEBRETHON et al., 1994). Assim, podemos inferir que o transcrito MC2R esteve diminuído por redução de ligante, o que sugere insuficiência hipofisária. Quando o

animal é exposto a um mesmo estresse durante dias, este se torna adaptado aos estímulos, processo chamado de habituação, diminuindo a liberação de ACTH (MARTÍ; ARMARIO, 1998). Também há relatos de que a hiporresponsividade do eixo HPA frente ao estresse crônico se deve à falha na produção de CRH hipotalâmico, como causador da insuficiência hipofisária e adrenal (OSTRANDER et al., 2006).

Uma das enzimas que desempenha papel essencial para progressão da cascata esteroidogênica é uma desidrogenase chamada 3 $\beta$ HSD I, que faz a conversão da pregnenolona, derivada do colesterol, em progesterona, que é substrato para síntese de glicocorticoides (ZHAO et al., 1991). Sua expressão reduzida nas adrenais de animais portadores de tumor (Figura 4B) indica diminuição da atividade esteroidogênica das células da camada fasciculada, local de síntese de cortisol nos humanos e de corticosterona nos murinos.

Além dos resultados apresentados, foi estudada a expressão de StAR, um cofator para o transporte de colesterol do citosol para dentro da mitocôndria (CLEM et al., 2005). A expressão do gene StAR foi variável nos grupos estudados, não havendo diferença significativa entre os grupos (resultados não-apresentados). Este gene está relacionado com a regulação da fase aguda da biossíntese de esteroides relacionada à resposta imediata desencadeada pelo ACTH no estresse agudo. No estágio crônico do desenvolvimento tumoral em que se encontravam os animais estudados, é possível que a proteína StAR não possua papel relevante.



**Figura 4.** Análise da expressão de genes da glândula adrenal relacionados à esteroidogênese. Painéis superiores correspondem aos amplicons representativos de RT-PCR submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Em cada gráfico, a expressão do RNAm foi calculada para os genes MC2R (A), 3 $\beta$ HSD I (B), e TSPO (C) em relação à expressão do gene de controle interno, GAPDH. C = Grupo-controle, T = grupo com tumor, pb = pares de bases. ANOVA, \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

TSPO é um cofator do transporte de colesterol para a mitocôndria, desempenhando papel-chave na regulação da esteroidogênese, pois a alteração na sua expressão resulta em inibição desse transporte (AMRI et al., 1997). A expressão do RNAm do gene que codifica a proteína translocadora TSPO apresentou tendência à redução no Grupo-tumor ( $p = 0,052$ ). Este resultado também aponta para uma disfunção do córtex adrenal.

O presente trabalho sustenta a hipótese de que a resposta aguda ao estresse ocorreu durante os primeiros dias da evolução tumoral, não sendo esta resposta detectada no momento da realização dos experimentos, pois o sacrifício dos animais foi realizado em fase avançada de caquexia. Na progressão para resposta crônica, pode ocorrer diminuição na produção de glicocorticoides pela adrenal, corroborando com a demonstração de autores que indicam que a fisiopatologia da resposta de estresse inclui facilitação na resposta inicial da adrenal, seguida de habituação e posteriormente diminuição da resposta do eixo HPA (ARMARIO et al., 1986; OSTRANDER et al., 2006). Adicionalmente, o hipocortisolismo tem sido abordado em desordem de estresse pós-traumático, síndrome da fadiga crônica e fibromialgia, e o estresse crônico parece ser fator contribuinte no desenvolvimento desses estados de doença, causando disfunção endócrina que leva à hiporresponsividade do eixo HPA (OSTRANDER et al., 2006).

No caso da disfunção adrenal primária, a presença de células metastáticas é fator que pode participar do processo. Esta hipótese deve ser levada em conta ao se estudar genes relacionados à função adrenal em animais portadores de tumor, sendo compatível com o nível de expressão gênica reduzido, demonstrado em nossos resultados. Portanto, em situações de estresse crônico, como ocorre durante a evolução tumoral, a resposta adrenal pode estar prejudicada por uma extensiva destruição do tecido adrenal causada por metástase, ou ainda pelo aumento dos níveis de citocinas inflamatórias que poderia inibir diretamente a síntese de corticosteroides (COOPER; STEWART, 2003).

### Conclusão

Com o desenvolvimento da caquexia decorrente da evolução tumoral no modelo experimental de tumor de Walker, a resposta de estresse agudo caracterizada por hiperfunção das células adrenocorticais é substituída pela resposta crônica.

No décimo dia pós-inoculação de células LLC-WRC 256, o volume tumoral tornou-se considerável e o desenvolvimento do tumor submeteu o animal a estresse contínuo. O estudo da glândula adrenal nesta fase revelou diminuição na expressão de genes que codificam fatores importantes na esteroidogênese adrenal: MC2R, 3 $\beta$ HSD I e TSPO, indicando falência da glândula adrenal. Portanto, o mecanismo responsável pela diminuição da expressão gênica está relacionado à inibição do eixo HPA que pode ser provocada pelo estresse crônico e pela presença de citocinas inflamatórias. Além disso, pode haver participação de um mecanismo primário associado a este processo, caracterizado pela falência da própria glândula adrenal, causada por processo metastático ou por fatores intrínsecos ao processo de esteroidogênese.

### Agradecimentos

Apoio financeiro: Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Araucária e PROPPG-Uel - Pró-reitoria de Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina e FAEPE/Uel Edital 2007. Os seguintes autores receberam bolsas de pesquisa: M.N.A., mestrado/Capes; N.A.S., PROIC-Uel; L.D.B., Pibic-CNPq. Agradecemos ao Prof. Rubens Cecchini (PAT/CCB/Uel), pelas células tumorais de Walker 256, bem como a Pedro Dionizio Filho e Jesus Antônio Vargas, pelo excelente apoio técnico.

### Referências

- ABBASZADE, I. G.; CLARKE, T. R.; PARK, C. H.; PAYNE, A. H. The mouse 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase multigene family includes two functionally distinct groups of proteins. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. 9, p. 1214-22, 1995.
- AKINGBEMI, B. T.; SOTTAS, C. M.; KOULOVA, A. I.; KLINEFELTER, G. R.; HARDY, M. P. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 592-603, 2004.
- AMRI, H.; DRIEU, K.; PAPADOULOS, V. Ex vivo regulation of adrenal cortical cell steroid and protein synthesis, in response to adrenocorticotrophic hormone stimulation, by the ginkgo biloba extract EGb 761 and isolated ginkgolide B. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 5415-5426, 1997.
- ARMARIO, A.; LOPEZ-CALDERON, A.; JOLIN, T.; BALASH, J. Response of anterior pituitary hormones to

- chronic stress. The specificity of adaptation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 10, n. 3, p. 245-50, 1986.
- BOSSOLA, M.; PACELLI, F.; TORTORELLI, A.; DOGLIETTO, G. B. Cancer cachexia: it's time for more clinical trials. **Surgical Oncology**, v. 14, n. 2, p. 276-285, 2007.
- CHIDA, D.; NAKAGAWA, S.; NAGAI, S.; SAGARA, H.; KATSUMATA, H.; IMAKI, T.; SUZUKI, H.; MITANI, F.; OGISHIMA, T.; SHIMIZU, C.; KOTAKI, H.; KAKUTA, S.; SUDO, K.; KOIKE, T.; KUBO, M.; IWAKURA, Y.; Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 46, p. 18205-18210, 2007.
- CHIKANZA, I. C.; GROSSMAN, A. B. Reciprocal interactions between the neuroendocrine and immune systems during inflammation. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 26, n. 4, p. 693-711, 2000.
- CLARK, A. J.; BAIG, A.H.; NOON, L.; SWORDS, F. M.; HUNYADY, L.; KING, P. J. Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R). **New York Academy of Sciences**, v. 994, n. 1, p. 111-117, 2003.
- CLEM, B. F.; HUDSON, E. A.; CLARK, B. J. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) enhances cAMP-responsive element binding (CREB) protein phosphorylation and phospho-CREB interaction with the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1348-1356, 2005.
- COCHAND-PRIOLETT, B.; PRAT, J. J.; POLIVKA, M.; THIENPONT, L.; DAHAN, H.; GUILLAUSSEAU, P. J. Thyroid fine needle aspiration: the morphological features on ThinPrep slide preparations. Eighty cases with histological control. **Cytopathology**, v. 14, n. 6, p. 343-349, 2003.
- COOPER, M. S.; STEWART, P. M. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 8, p. 727-734, 2003.
- EMERY, P. W. Cachexia in experimental models. **Nutrition**, v. 15, n. 7-8, p. 600-603, 1999.
- FEARON, K. C.; MOSES, A. G. Cancer cachexia. **International Journal of Cardiology**, v. 85, n. 1, p. 73-81, 2002.
- FLÜCK, C. E.; MILLER, W. L. Disorders of the human adrenal cortex. **Endocrine Development Basel**, v. 13, p. 99-116, 2008.
- IDELMAN, S.; VERDETTI, J. **Les glandes surrénales endocrinologie et communications cellulaires**. Grenoble: EDP Sciences, 2000.
- KOEHNLEIN, E. A.; SALADO, G. A.; YAMADA, A. N.; SILVA, A. A. Avaliação do estado nutricional de pacientes em diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC). **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 31, n. 1, p. 57-63, 2009.
- LEBRETHON, M. C.; NAVILLE, D.; BEGOT, M.; SAEZ, J. M. Regulation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin 11. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 4, p. 1828-1833, 1994.
- LEE, J. J.; EISENBERG, P.; PAPADOPOULOS, V.; WANG, J.; WIDMAIER, E. P. Reversible changes in adrenocorticotropin (ACTH)-induced adrenocortical steroidogenesis and expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor during the ACTH-insensitive period in young rats. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2165-2173, 2004.
- MARTÍ, O.; ARMARIO, A. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 241-260, 1998.
- MAZZUCO, T. L.; HERRERA, A. C. S. A.; FONSECA, E. A. I. Interesse do Estudo dos Tumores Adrenocorticais em Patologia Experimental e Clínica. In: WATANABE, M. A. E.; ONO, M. A.; CECCHINI, R.; ITANO, E. N. (Org.). **Tópicos em patologia experimental**. Londrina: Eduel, 2008. p. 177-200.
- OKAMOTO, T.; FURUYA, M.; YAMAKAWA, T.; YAMAMURA, K.; HINO, O. TNF-alpha gene expression in the liver of the IFN-gamma transgenic mouse with chronic active hepatitis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, n. 3, p. 762-768, 1996.
- OSTRANDER, M. M.; ULRICH-LAI, Y. M.; CHOI, D. C.; RICHTAND, N. M.; HERMAN, J. P. Hypoactivity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis during Recovery from Chronic Variable Stress. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 2008-2017, 2006.
- PEREIRA, S. R. C.; DARRONQUI, E.; CONSTANTIN, J.; ROCHA, M. H. R. A.; YAKAMOTO, N. S.; BRACHT, A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1688, n. 3, p. 187-196, 2004.
- RAFF, H.; HONG, J. J.; OAKS, M. K.; WIDMAIER, E. P. Adrenocortical responses to ACTH in neonatal rats: effect of hypoxia from birth on corticosterone, StAR, and PBR. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 1, p. 78-85, 2003.
- REICHE, E. M.; MORIMOTO, H. K.; NUNES, S. M. Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development and progression of cancer. **International Review of Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 515-527, 2005.
- RIVADENEIRA, D. E.; NAAMA, H. A.; McCARTER, M. D.; FUJITA, J.; EVOY, D.; MACKRELL, P.; DALY, J. M. Glucocorticoid Blockade Does Not Abrogate Tumor-Induced Cachexia. **Nutrition and Cancer**, v. 35, n. 2, p. 202-206, 1999.
- RUSSELL, S. T.; TISDALE, M. J. The role of glucocorticoids in the induction of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein expression in adipose tissue in cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 1, p. 876-881, 2005.
- SALZMANN, C.; OTIS, M.; LONG, H.; ROBERGE, C.; GALLO-PAYET, N.; WALKER, C. D. Inhibition of steroidogenic response to adrenocorticotropin by leptin: implications for the adrenal response to maternal separation in neonatal rats. **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1810-1822, 2004.

- SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 59-77, 2006.
- STEWART, P. M. The adrenal cortex. In: LARSEN, P. R.; KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K. S. (Ed.). **Williams textbook of endocrinology**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2003. cap.14, p. 491-551.
- SUZUKI, P. S.; OLIVEIRA, K. B.; AOKI, M. N.; TATAKIHARA, V. L. H.; BORELLI, S. D. E.; WATANABE, M. A. E. Investigating the association of chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphism with cervical cancer in human papillomavirus (HPV) positive patients. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 30, n. 2, p. 95-100, 2008.
- TAYEK, J. A.; ISTRAN, N. W.; JONES, C. T.; HAMAWY, K. J.; BRISTIAN, B. R.; BLACKBURN, G. L. Influence of Walker-256 carcinosarcoma on muscle, tumor, and whole-body protein synthesis and growth rate in the cancer-bearing rat. **Cancer Research**, v. 46, n. 1, p. 5649-5654, 1986.
- TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 438-442, 2001.
- ZALOGA, G. P. Sepsis-induced adrenal deficiency syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 3, p. 688-690, 2001.
- ZEPP, E. A.; GRAY, M. V. Hormones of the pituitary-adrenal axis in rats bearing the Walker 256 carcinoma. **Cancer Letters**, v. 18, n. 2, p. 149-155, 1983.
- ZHAO, H. F.; LABRIE, C.; SIMARD, J.; DE LAUNOIT, Y.; TRUDEL, C.; MARTEL, C.; RHEAUME, E.; DUPONT, E.; LUU-THE, V.; PELLETIER, G. Characterization of rat 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase cDNAs and differential tissue-specific expression of the corresponding mRNAs in steroidogenic and peripheral tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 1, p. 583-593, 1991.

*Received on March 25, 2009.*

*Accepted on April 22, 2009.*

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.