

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Hipercortisolismo Experimental Induzido por ACTH em Ratos Wistar –
Correlações Clínicas em Medicina Veterinária**

Renata Ribeiro Novais de Carvalho

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

**HIPERCORTISOLISMO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR –
CORRELAÇÕES CLÍNICAS EM MEDICINA VETERINÁRIA**

RENATA RIBEIRO NOVAIS DE CARVALHO

Sob a Orientação do Professor
Luís Carlos Reis

Dissertação submetida
como requisito parcial para
obtenção do grau de
Mestre em Ciências, no
Curso de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária,
Área de Concentração em
Ciências Clínicas

Seropédica, RJ
Novembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

RENATA RIBEIRO NOVAIS DE CARVALHO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/08/2012

Prof. Dr. Luís Carlos Reis – UFRRJ
(Orientador)

Prof. Dr. Victor Alejandro Castillo –UBA

Prof. Dra. Alba Cenélia Matos da Silva

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à equipe do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, verdadeiros mestres, por acreditarem em mim e me atíçarem o gosto pela pesquisa.

“Mestre não é aquele que aprendeu a ensinar, mas aquele que ensina a aprender”

(Marcelo Soriano)

AGRADECIMENTOS

“Nenhum de nós é tão bom quanto todos nós juntos” e por isso agradeço a cada um que esteve comigo direta ou indiretamente neste trabalho:

Ao Professor Luís Carlos Reis, o grande Mestre, por me aceitar como orientada sem nunca ter trabalhado comigo antes; por incentivar as minhas “viagens científicas” e freá-las quando foi necessário; por ser inspirador tanto profissionalmente como no lado pessoal. Muito obrigada por esses 2 anos de trabalho e amizade. Defendo este trabalho com a certeza de que não poderia ter estado em melhores mãos;

À Fabrícia que foi a primeira mão estendida quando eu ainda me sentia de fora no laboratório. Sem ela, tenho certeza que os rumos deste projeto não seriam os mesmos. É assustador encontrar pessoas como você nos dias de hoje, prontas para ajudar e com um brilho incentivador (“É só estudar” - lembra? Rs)! Muito, muito, muito obrigada! Obrigada por ter sido também a minha co-orientadora, minha inspiração para escrever (de perto e de longe, mostrando que parceria se faz mesmo à distância) e pela amizade construída;

Ao Robertinho, pessoa muito especial. Uma das pessoas mais inteligentes que conheço! Terminar o mestrado com a certeza do dever cumprido só pode ficar melhor quando, além do ponto de vista profissional, crescemos também como pessoa. Tê-lo como meu amigo é um dos maiores presentes que levo desta etapa. Muito, muito, muito obrigada! “Bixooooooooo!” (e eu me controlo?);

Ao André Mecawi pela ajuda tanto prática com as dosagens hormonais, como científica com ideias e questionamentos importantíssimos para a elaboração do projeto;

Aos Professores do DCF, em especial aos Mestres Alba, Bruno, Emerson, Fábio, Magda e Wellington que contribuíram como inspiração e também pelos ensinamentos;

Aos demais integrantes da equipe executora deste estudo Anderson, Güínever e Víctor pelo apoio prático, troca de ideias e risadas garantidas;

À Cristine, Natália, Nayana e Rafaela, pelos ensinamentos no laboratório. E à Verônica Menezes pelas incansáveis trocas de caixas de animais no biotério;

À Raquel Teixeira por toda ajuda e pela parceria formada ao longo desses dois anos;

À Andressa Medeiros, Nathalia Senne, Tatiana Salomão, Dina, Kiko e Areta por terem abrigado a mim e a Tuca durante a fase em que cursei as disciplinas;

Aos funcionários do DCF por todo o auxílio e por estarem sempre dispostos a ajudar;

Aos demais integrantes do DCF por toda e qualquer ajuda sempre bem vinda e por me mostrarem que também sou do ‘time’;

À Rural que, em 10 anos de convívio, foi não só a grande escola profissional, mas da vida. Lugar onde fiz os melhores amigos que tenho e aprendi a ser “gente grande”. Em todos esses anos, não houve um dia em que eu não admirasse a beleza e imponência desta casa;

Ao professor e coordenador do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária Paulo Botteon por incentivar a pesquisa e guiar nossos passos para juntos sermos melhores profissionais e contribuirmos para o sucesso do curso;

À professora Rita Botteon por todo direcionamento durante a elaboração deste trabalho, estando incrivelmente certa na maioria das vezes. E também por ser um exemplo de que garra e determinação devem ser bases de um trabalho bem feito;

À Lorena e Regina por serem anjos salvadores em diversos momentos ao longo desses dois anos, sempre muito prestativas, objetivas e simpáticas;

Ao apoio das agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ;

A todos os pós-graduandos com quem tive a oportunidade de dividir salas de aula que sempre foram fontes de troca de informações e divertimento, em especial Bruno Spíndola e

Fabrcio Gaudcncio que, sem saberem, contribuaram l no comecinho nas aulas da Rita com ideias para o projeto;

 Vivian Nogueira pela disbonibilidade e boa vontade em todos os momentos em que foi solicitada, bem como ao professor José Mauricio Barbanti Duarte e Mauricio Christofolletti da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho pela disponibilidade e interesse mesmo que os rumos tenham mudado ao longo da elaboração do projeto;

 Mariana Bezerra e Suzana-Gmula por toda torcida l no comecinho quando o primeiro obstáculo era apresentar o projeto e ser aceita como orientada pelo Mestre Luís;

 professora Regina Ramadinha por fazer parte da minha formação profissional e ter me apresentado ao professor Victor Castillo;

Ao Professor Victor Castillo por se mostrar sempre por perto quando solicitado, me incluindo no envio de seus trabalhos e de sua equipe para a turma do Brasil e também pela inspiração que foi para que eu trabalhasse com endocrinologia;

Ao professor João Telhado pelo apoio, conselhos e risadas garantidas;

Ao Nando (Fernando Seara) pelo incentivo, apoio e ajuda na dissertação, pela inspiração, paciência e companheirismo nesta fase difrcil que é a reta final do mestrado;

Aos meus amigos incríveis Diego, Edna, Eri, Lu, Marco, Paty e Tati por estarem ao meu lado há 10 anos e especialmente por nesses últimos 2 anos terem feito da minha loucura momentos de descontração e também por segurarem comigo os meus problemas me fazendo perceber o quanto sou importante também pra eles. Meus irmãos, esse pequeno parágrafo jamais vai traduzir o que penso e sinto por vcs! Muito, muito, muito obrigada!;

A minha família mesmo sem entender “o que ela faz com os ratinhos” por nunca duvidar das minhas escolhas e incentivar e torcer a cada passo meu. Amo vocês!

LISTA DE FIGURAS

1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal	04
6.1 Efeitos da estimulação com ACTH sobre o eixo HHA em ratos	30
6.1 A: Corticosterona plasmática	30
6.1 B: Peso da adrenal direita	31
6.1 C: Peso da adrenal esquerda	31
6.1 D: Peso hipotálamo	32
6.1 E: Peso hipófise	33
6.2 Efeitos da estimulação com ACTH no metabolismo energético em ratos	33
6.2 A: Peso corporal dos animais	33
6.2 B: Ingestão alimentar diária	34
6.2 C: Peso do tecido adiposo peritoneal	34
6.2 D: Peso do fígado	35
6.3 Efeitos da estimulação com ACTH sobre o equilíbrio hidroeletrólítico	35
6.3 A: Ingestão hídrica diária	36
6.3 B: Ingestão diária de salina hipertônica	36
6.3 C: Preferência por sódio	37
6.3 D: Produção urinária	37
6.3 E: Nível de ocitocina plasmática	38
6.3 F: Nível de AVP plasmática	38
6.3 G: Peso do rim direito	39
6.3 H: Peso do rim esquerdo	39
6.3 I: Peso do coração	41
6.4 Efeitos da estimulação com ACTH sobre a função tireóidea	41
6.4 A: Nível de T3 plasmático	41
6.4 B: Nível de T4 plasmático	42
6.4 C: Nível de TSH plasmático	42
6.4 D: Peso da tireoide	

LISTA DE SIGLAS

ANG II: Angiotensina II

AT1: Receptor para angiotensina tipo 1

AVP: Arginina Vasopressina

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

AMPc: adenosina-3,5-monofosfato cíclico

CRH: Hormônio liberador da corticotrofina

GCs: glicocorticoides

HAC: Hiperadrenocorticismo

HHA: Hipotálamo hipófise adrenal (eixo)

HPA: Hipotálamo pituitária adrenal (eixo)

HPT: Hipotálamo pituitária tireoide (eixo)

OT: Ocitocina

OVLT: Órgão vascular da lâmina terminal

PVN: Núcleo paraventricular

SFO: Órgão subfornical

SNC: Sistema Nervoso Central

T3: Triiodotironina

T4: Tetraiodotironina

TSH: Hormônio estimulador da tireoide

RESUMO

CARVALHO, Renata Ribeiro Novais de. **Hipercortisolismo Experimental em Ratos Wistar – Correlações Clínicas em Medicina Veterinária**. 2012. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Os glicocorticoides são hormônios sintetizados e liberados pela ativação do eixo hipotálamo hipófise adrenal e exercem funções fundamentais para garantir a homeostase, atuando em processos biológicos, tais como crescimento, reprodução, metabolismo energético, respostas imunes e inflamatórias, alterações comportamentais, ações no sistema nervoso central (SNC) e funções cardiovasculares. A corticosterona é o glicocorticoide presente em maior quantidade em camundongos e ratos, enquanto cortisol é o glicocorticoide prevalente em humanos e cães. Os níveis plasmáticos de glicocorticoides estão alterados em diversas enfermidades, tendo destaque o hiperadrenocorticismos hipófise dependente que, apesar de ser descrito desde 1932, continua sendo relatado como um verdadeiro desafio para o clínico, uma vez que, os mecanismos fisiopatológicos não estão completamente elucidados. Portanto, objetiva-se com este trabalho fornecer bases para a padronização de um modelo experimental para esta doença a fim de, futuramente, permitir a sugestão de novos meios de diagnóstico, bem como propor novos tratamentos. Para a realização deste experimento, foram divididos dois grupos (controle e tratados) contendo sete animais cada. O grupo controle foi submetido a aplicações diárias de salina isotônica no volume de 0,2ml pela via subcutânea durante 7 dias. Já o grupo tratado recebeu de ACTH sintético pela mesma via, volume e tempo de tratamento do grupo controle. Após a eutanásia no sétimo dia de experimento, foram obtidas amostras de plasma sanguíneo (para determinação dos níveis de triiodotironina e tiroxina, corticosterona, ocitocina, vasopressina e hormônio estimulador da tireoide), e órgãos (para avaliação da alteração dos pesos relativos). Apesar das alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, obteve-se aumento significativo dos níveis plasmáticos de corticosterona ($5,63 \pm 1,01$ vs. $8,31 \pm 0,60 \mu\text{g/dl}$ $p < 0,05$), além do aumento do peso relativo das adrenais direita ($0,0094 \pm 0,01$ vs. $0,05 \pm 0,01 \text{g}/100\text{g}$ $p < 0,0001$) e esquerda ($0,01 \pm 0,01$ vs. $0,05 \pm 0,01 \text{g}/100\text{g}$ $p < 0,0001$) e da hipófise ($0,0025 \pm 0,0008$ vs. $0,0033 \pm 0,0001 \text{g}/100\text{g}$ $p < 0,0001$). Já o hipotálamo não sofreu alteração significativa. O peso dos animais tratados sofreu redução significativa a partir do quinto dia, quando comparado ao grupo controle ($282,14 \pm 14,01$ vs. $227,86 \pm 12,67 \text{g}$ $p < 0,05$; $285,71 \pm 13,29$ vs. $215,00 \pm 11,80 \text{g}$ $p < 0,001$). Da mesma forma, houve queda na ingestão alimentar representada apenas no segundo dia ($9,09 \pm 0,49$ vs. $5,59 \pm 0,57 \text{g}/100\text{g}$ $p < 0,0001$). O tecido adiposo peritoneal reduziu consideravelmente no grupo tratado ($0,97 \pm 0,12$ vs. $0,45 \pm 0,07 \text{g}/100\text{g}$ $p < 0,001$) e o fígado ($3,43 \pm 0,84$ vs. $4,75 \pm 0,16 \text{g}/100\text{g}$ $p < 0,0001$) desses animais demonstrou-se aumentado de tamanho em comparação com o grupo controle. As alterações no equilíbrio hidroeletrólítico foram significativas na ingestão de água nos dias 4, 5 e 6 ($8,86 \pm 0,19$ vs. $17,01 \pm 3,22$ $p < 0,001$; $8,22 \pm 0,26$ vs. $14,40 \pm 2,71$ $p < 0,05$; $8,65 \pm 0,34$ vs. $25,69 \pm 1,67 \text{ml}/100\text{g}$ $p < 0,0001$) e salina a partir do segundo dia ($0,09 \pm 0,05$ vs. $14,11 \pm 1,70$; $0,11 \pm 0,07$ vs. $21,76 \pm 2,22$; $0,01 \pm 0,01$ vs. $24,13 \pm 2,22$; $0,13 \pm 0,10$ vs. $24,86 \pm 2,96$; $0,18 \pm 0,16$ vs. $21,57 \pm 3,77 \text{ml}/100\text{g}$ $p < 0,0001$ para todos os dias) no grupo induzido com ACTH, bem como a produção urinária também significativa a partir do segundo dia ($3,99 \pm 0,28$ vs. $17,56 \pm 1,10$; $3,63 \pm 0,38$ vs. $25,46 \pm 2,01$;

3,69±0,28 vs. 29,70±2,02; 3,63±0,19 vs. 33,97±2,77; 4,14±0,31 vs. 41,52±4,25ml/100g p<0,0001 para todos os dias), peso do coração (0,35±0,02 vs. 0,53±0,02g/100g p<0,0001) e rins direito (0,30±0,04 vs. 0,56±0,01g/100g p<0,001) e esquerdo (0,340±0,006 vs. 0,543±0,016g/100g p<0,0001). Já os níveis plasmáticos de ocitocina e vasopressina estavam diminuídos nesta mesma comparação (1,53±0,19 vs. 0,70±0,16pg/ml p<0,05; 1,34±0,10 vs. 0,71±0,08pg/ml p<0,001). Sobre o eixo tireóideo, pode-se observar redução nos níveis plasmáticos de triiodotironina (90,71±2,84 vs. 56,67±3,49ng/dL p<0,0001) e tiroxina (4,9±0,1 vs. 2,2±0,2µg/dL p<0,0001), mas nenhuma alteração significativa nos níveis de TSH, bem como no peso da tireoide. Os dados obtidos sugerem este protocolo como base para a determinação de um modelo experimental de HAC hipófise-dependente embora possamos concluir que o tempo de tratamento proposto possa representar a fase aguda da doença.

Palavras-chave: Glicocorticoide. Hiperadrenocorticismo. Modelo experimental.

ABSTRACT

CARVALHO, Renata Ribeiro Novais de. **Pituitary dependent hyperadrenocorticism in Wistar Rats: Experimental View.** 2012.64f. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Glucocorticoids are hormones synthesized and released by activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and perform essential functions for ensuring the homeostasis, acting on biological processes such as growth, reproduction, energy metabolism, immune and inflammatory responses, behavioral changes, actions in the nervous system (CNS) and cardiovascular functions. Corticosterone is the most important glucocorticoid present in mice and rats, while cortisol is prevalent in humans and dogs. Plasma levels of glucocorticoids are altered in various diseases. Pituitary dependent hyperadrenocorticism is highlighted because, despite being described since 1932, continues to be reported as a real challenge for the clinician, due to pathophysiological mechanisms are not fully elucidated. For this reason, the objective of this study is to provide a basis for the standardization of an experimental model for this disease and, in the future, allow the suggestion of new diagnostics, as well as propose new treatments. For this experiment, were divided two groups (control and treated) with seven animals in both groups. The control group was submitted to daily applications of saline subcutaneously with 0.2ml of volume for 7 days. While treated group was submitted to applications of synthetic ACTH₁₋₂₄ by the same route, treatment time and volume of the control group. After euthanasia on the seventh day of experiment, samples were obtained from blood plasma (to determine the levels of triiodothyronine, thyroxine, corticosterone, oxytocin, vasopressin and thyroid stimulating hormone) and organs (to assess the change in the relative weights). In relation to changes of the hypothalamic pituitary adrenal axis, we obtained a significant increase in plasma corticosterone (5.63±1.01 vs. 8.31±0.60µg/dl p<0.05) and increased the relative weight of right (0.0094±0.01 vs. 0.05±0.01g/100g p<0.0001) and left (0.01±0.01 vs. 0.05±0.01g/100g p<0.0001) adrenal and pituitary (0.0025±0.0008 vs. 0.0033±0.0001g/100g p<0.0001). Hypothalamus did not change significantly. The weight of the treated animals was significantly decreased after the fifth day compared to the weight of control group (282.14±14.01 vs. 227.86±12.67g p<0.05; 285.71±13.29 vs. 215.00±11.80g p<0.001). Similarly, there was a decrease in food intake only represented on the second day (9.09±0.49 vs. 5.59±0.57g/100g p<0.0001). The peritoneal fat considerably reduced in the treated group (0.97±0.12 vs. 0.45±0.07g/100g p<0.001) and liver demonstrated to be increased (3.43±0.84 vs. 4.75±0.16g/100g p<0.0001) in size in comparison with the control group. Changes in fluid and electrolyte were important in drinking water at 4, 5 and 6 days (8.86±0.19 vs. 17.01±3.22 p<0.001; 8.22±0.26 vs. 14.40±2.71 p<0.05; 8.65±0.34 vs. 25.69±1.67ml/100g p<0.0001) and saline since second day (0.09±0.05 vs. 14.11±1.70; 0.11±0.07 vs. 21.76±2.22; 0.01±0.01 vs. 24.13±2.22; 0.13±0.10 vs. 24.86±2.96; 0.18±0.16 vs. 21.57±3.77ml/100g p<0.0001 all days) in which a significant increase induced ACTH group compared with the control group, urine output (3.99±0.28 vs. 17.56±1.10; 3.63±0.38 vs. 25.46±2.01; 3.69±0.28 vs. 29.70±2.02; 3.63±0.19 vs. 33.97±2.77; 4.14±0.31 vs. 41.52±4.25ml/100g p<0.0001 all days) as well as the weight of heart (0.35±0.02 vs. 0.53±0.02g/100g p<0.0001) and right (0.30±0.04 vs.

0.56±0.01g/100g p<0.001) and left (0.340±0.006 vs. 0.543±0.016g/100g p<0.0001) kidneys. Plasma levels of oxytocin and vasopressin were decreased (1.53±0.19 vs. 0.70±0.16pg/ml p<0.05; 1.34±0.10 vs. 0.71±0.08pg/ml p<0.001) in the same comparison. On thyroid axis, we observed a reduction in plasma levels of triiodothyronine (90.71±2.84 vs. 56.67±3.49ng/dL p<0.0001) and thyroxine (4.9±0.1 vs. 2.2±0.2µg/dL p<0.0001), but no significant change in the levels of thyroid stimulating hormone and the weight of the thyroid. The data suggest this protocol as a basis for determining an experimental model of pituitary dependent hyperadrenocorticism although we can conclude that the proposed treatment time may represent the acute phase of disease.

Keywords: Glucocorticoid. Hyperadrenocorticism. Experimental model.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Papel do eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal no HAC	3
1.2 Efeito do HAC na função tireoidiana	5
1.3 Efeitos do HAC na homeostase hidroeletrólítica e cardiovascular	6
1.4 Efeitos do HAC no metabolismo energético	9
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Apreciação Bioética	13
3.2 Local	13
3.3 Animais	13
3.4 Grupos experimentais	13
3.5 Protocolo de Ingestão de Água e Alimento	14
3.6 Coleta de sangue	14
3.7 Procedimentos para dosagens hormonais	14
3.7.1 Extração de hormônios	14
3.8 Peso relativo de órgãos	15
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
5 ORÇAMENTO	17
6 RESULTADOS	18
6.1 Efeitos da estimulação com ACTH sobre o eixo HHA em ratos	18

6.2 Efeitos da estimulação com ACTH no metabolismo energético em ratos	21
6.3 Efeitos da estimulação com ACTH sobre o equilíbrio hidroeletrólítico	23
6.4 Efeitos da estimulação com ACTH sobre a função tireóidea	29
7 DISCUSSÃO	31
7.1 Efeitos da estimulação com ACTH sobre o eixo HHA em ratos	31
7.2 Efeitos da estimulação com ACTH no metabolismo energético	32
7.3 Efeito da estimulação com ACTH na homeostase hidroeletrólítica e cardiovascular	34
7.4 Efeito da estimulação com ACTH na função tireoidiana	35
8 CONCLUSÃO	37
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

Os glicocorticoides (GCs) são hormônios que exercem diversas ações nos tecidos em todo o organismo, e essas ações têm sido reconhecidas como produtoras de efeitos rápidos (não genômicos) e tardios (genômicos) nas respostas fisiológicas e comportamentais (KELLER-WOOD et al., 1984). Eles estão envolvidos em quase todos os mecanismos celulares e moleculares do organismo e desempenham papel fundamental nos processos biológicos, tais como crescimento, reprodução, metabolismo energético, respostas imunes e inflamatórias, ações no sistema nervoso central (SNC) e funções cardiovasculares (CHROUSOS et al., 2004). Além disso, participam de forma crucial na manutenção da homeostase, integrando várias respostas fisiológicas vitais. Nessa manutenção, eles são responsáveis pela resposta comportamental e física ao estresse (TSIGOS & CHROUSOS, 2002). A corticosterona é o glicocorticoide presente em maior quantidade em camundongos e ratos, enquanto cortisol é o glicocorticoide prevalente em humanos e cães (ARAMPATZIS et al., 2005). Esses hormônios se ligam a dois tipos de receptores no cérebro: receptores de mineralocorticoides (MRs) que ligam corticosterona, cortisol e aldosterona com grande afinidade; e receptores de glicocorticoides (GRs) com afinidade aproximadamente 10 vezes maior para corticosterona e cortisol (DE KLOET et al., 2005). O *feedback* operado pelos glicocorticoides é um mecanismo de modulação inibitória do sistema adrenocortical (KELLER-WOOD et al., 1984).

Os níveis de GCs estão elevados em endocrinopatias, infecções, estresse e várias condições traumáticas ou tratamentos clínicos (DARDAVET et al., 1995). Dentre as alterações mais importantes, está o hiperadrenocorticismismo (HAC). Apesar de haver pouca informação epidemiológica sobre a incidência e prevalência de HAC (GUARALDI et al., 2012), sabe-se que esta doença é interessantemente mais comum em cães do que em humanos (KOOISTRA et al., 2009).

O HAC é também conhecido como Síndrome de Cushing e foi assim nomeado em 1932 após os primeiros relatos da doença por Harvey Cushing. (SMETS, 2010). Apesar de possuir diversas origens fisiopatológicas para a mesma enfermidade, todas resultam em excesso crônico de cortisol sérico. Dentre as classificações fisiopatológicas do HAC, merecem destaque em medicina veterinária: (1) Hiperadrenocorticismismo dependente da hipófise (tumores hipofisários que sintetizam e secretam ACTH em excesso com hiperplasia adrenocortical secundária); (2) Hiperadrenocorticismismo neoplásico (excesso

primário de cortisol secretado por adenoma ou adenocarcinoma adrenocortical); e (3) Hiperadrenocorticismo iatrogênico (resultante de corticoterapia prolongada ou em altas doses) (FELDMAN & NELSON, 2004).

Dentre os tipos de HAC citados, dados epidemiológicos confirmam a prevalência, tanto em cães como em gatos, de adenomas corticotróficos funcionais originários tanto do lobo anterior como da parte intermediária da glândula hipófise (ou pituitária) de aproximadamente 80-85% dos casos crônicos de excesso de glicocorticoide endógeno são devidos a adenomas corticotróficos funcionais. Os demais 15-20% dos casos de hipercortisolismo espontâneo são devidos a adenomas adrenocorticais ou carcinomas (KOOISTRA et al., 2009).

A apresentação clínica da doença de Cushing é muito semelhante entre cães e humanos (KOOISTRA et al., 2009). A exposição crônica ao excesso de cortisol muitas vezes resulta no desenvolvimento de uma combinação clássica de sinais clínicos e lesões que podem ser discretas ou graves. Entre os sinais mais comuns estão: polifagia, polidipsia, poliúria, aumento abdominal, alopecia, piodermites, dispneia, fraqueza muscular e letargia (DE MARCO, 2009).

O hipercortisolismo crônico diminui a secreção de TSH pela hipófise e causa hipotireoidismo secundário (FELDMAN & NELSON, 2004). Aproximadamente 70% dos cães com hiperadrenocorticismo hiperplásico apresentam níveis diminuídos da concentração sérica de T4 e/ou T3 (FELDMAN & NELSON, 2004).

Adicionalmente, os efeitos sistêmicos da concentração excessiva de glicocorticoides podem predispor os pacientes a complicações como *diabetes mellitus*, infecções recorrentes (por exemplo em trato urinário ou pele), deficiência de cicatrização, e enfraquecimento dos tecidos conjuntivos, o que pode favorecer o surgimento de desordens como ruptura do ligamento cruzado cranial (FELDMAN & NELSON, 2004).

Desde o primeiro relato, a abordagem diagnóstica da síndrome tem representado uma questão reptante para o endocrinologista, uma vez que não há anormalidades laboratoriais de rotina específicas para HAC (REIMONDO et al., 2008), dificultando a conclusão de um diagnóstico preciso bem como a escolha do tratamento eficiente (FINDLING & RAFF, 2005; LABEUR et al., 2006). Além disso, até o momento, não há registro na literatura de um modelo experimental específico para HAC. Este modelo se torna necessário devido a não elucidação de diversos mecanismos fisiopatológicos que podem representar a base para a determinação de novos métodos de diagnóstico bem como de tratamento.

1.1 Papel do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal no HAC

Os níveis de glicocorticoides são regulados pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (ou hipotálamo-pituitária-adrenal; HPA), que é responsável pela cascata de sinalização hormonal que inicia no cérebro e termina com a secreção de glicocorticoide pelo córtex adrenal (Figura 1). Um componente adicional do eixo HPA é o mecanismo de *feedback* negativo no qual o glicocorticoide atua na hipófise anterior e no cérebro suprimindo a atividade do eixo (LEVY, 2012). Desta forma, alterações fisiológicas de glândulas alvo como tireoide, adrenais e gônadas leva à perda da modulação inibitória de *feedback* negativo e resulta em hiperplasia compensatória das respectivas células pituitárias hormonais (MELMED, 2003).

O CRH é sintetizado pelos neurônios parvocelulares nos núcleos paraventriculares (PVN) do hipotálamo e secretado em resposta à estimulação do SNC (CROSS, 2011). O CRH, então, estimula a glândula hipófise e se apresenta em níveis diminuídos em humanos e cães com HAC (CROSS, 2011; PETERSON, 1989).

A glândula hipófise é dividida em 3 partes: lobo anterior (parte distal e parte infundibular da adeno-hipófise), parte intermediária da adeno-hipófise e o lobo posterior (contendo a neuro-hipófise). A neuro-hipófise secreta arginina vasopressina (AVP) e ocitocina (OT). A adeno-hipófise sintetiza e secreta diversos hormônios, incluindo: ACTH, beta-endorfina, hormônio estimulante da tireoide (TSH), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), hormônio do crescimento (GH) e prolactina. A parte distal é a maior parte da hipófise anterior e secreta ACTH e GH. Há uma população heterogênea na partes intermediária, na qual algumas células são similares aos corticotrofos da parte distal e também secretam ACTH. A morfologia celular predominante na parte intermediária, contudo, é o melanotrofo que secreta ACTH (MEJI, 2001).

As células produtoras de CRH podem sintetizar e liberar vasopressina (AVP). Na circulação portal, CRH e AVP se ligam aos receptores de um subconjunto de células, os corticotrofos, na hipófise anterior para estimular a secreção de ACTH na circulação sistêmica. ACTH, então, estimula a síntese e secreção sistêmica de glicocorticoides do córtex adrenal (LEVY, 2012). O ACTH é um polipeptídeo de cadeia simples de 39 aminoácidos sintetizado a partir do polipeptídeo de cadeia longa proopiomelanocortina

(POMC). O hormônio POMC é quebrado não somente em ACTH, mas também em beta-lipotropina, beta-endorfina e hormônio alfa-melanotrófico (MSH) (CROSS, 2011).

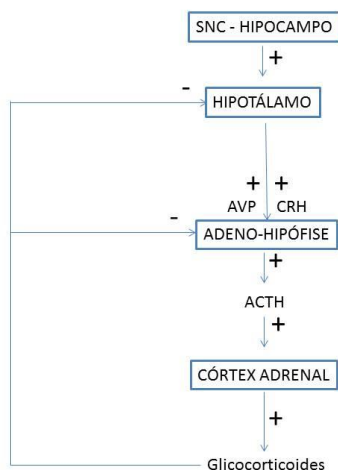


Figura 1 – Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Os sinais representados por + significam a estimulação e os sinais representados por - significam inibição num modelo em homeostasia.

O ACTH estimula a esteroidogênese via ativação de receptores acoplados à proteína G, fazendo parte da família de receptores da melanocortina. Tal via de sinalização ativa a proteína adenilciclase dependente de íon cálcio (Ca^{2+}), aumentando o nível de adenosina-3,5-monofosfato cíclico (AMPC), que ativa as proteína-quinases adrenocorticais. O resultado é a fosforilação de enzimas que aumentam a taxa de conversão de colesterol a pregnenolona. A ação do ACTH na glândula adrenal é rápida, dentro de minutos. Após sua liberação há um aumento da concentração de esteroides no sangue venoso da adrenal, sendo o cortisol detectável em 2-3 minutos após a administração de ACTH, e apenas 5% dos receptores precisam ser acionados para a resposta máxima (BUCKLEY & SCHATZBERG, 2005).

O córtex da adrenal é composto pela zona glomerulosa (ZG), zona fasciculada (ZF) e a zona mais interna, reticular (ZR). A função da ZR e ZF é secretar, como uma unidade, cortisol e andrógenos. O ACTH estimula a ZF e ZR a sintetizar 17α -hidroxipregnenolona e 17α -hidroxiprogesterona, que são precursores do cortisol.

O cortisol tem numerosas ações, incluindo a inibição de *feedback* de alça longa, ou seja, no PVN e alça curta na hipófise anterior. Centralmente, o eixo HPA recebe estímulos relevantes de outras áreas do cérebro, tais como o hipocampo e a amígdala (BUCKLEY & SCHATZBERG, 2005). Após a ligação dos GCs às proteínas chaperonas, eles são translocados para o núcleo, onde podem depois se ligar diretamente ao DNA na área de seus elementos de resposta. Isto, em termos, irá regular a transcrição de certos genes (CROSS, 2011).

A administração crônica de glicocorticoides pode interferir na regulação da expressão de genes catabólicos, levando a uma série de efeitos colaterais graves como ganho de peso, hiperglicemia e osteoporose (CANALIS et al. 2002). Embora altos níveis de glicocorticoides sejam essenciais numa reação aguda ao estresse, níveis cronicamente elevados podem ter efeitos negativos significativos na atividade funcional do cérebro (DINAN, 1994).

A observação de pacientes com a doença ou síndrome de Cushing geralmente revela intensa depressão e ansiedade, e o aumento da produção e secreção de glicocorticoides como o cortisol em pessoas saudáveis expostas ao estresse (GILLESPIE & NEMEROFF, 2005).

1.2 Efeito do HAC no *status* tireoidiano

A ação dos hormônios tireoidianos é essencial para a homeostase e metabolismo basal (MORLEY, 1981). É muito bem descrito na literatura que os glicocorticoides alteram a função tireoidiana em nível de hipotálamo e hipófise (HAUGEN, 2009; NICOLOFF et al., 1970; WILBER & UTIGER, 1969). Além disso, estudos demonstraram que os glicocorticoides exógenos alteram o controle hipotalâmico reduzindo a expressão de mRNA do hormônio liberador da tireotrofina (*Thyrotropin releasing hormone* – TRH) (ALKEMADE, 2005; WILBER, 1969).

Em excesso, o cortisol exerce retro-inibição sobre a liberação do TRH e do TSH no eixo hipotálamo-hipofisário (FELDMAN & NELSON, 1996). Adicionalmente, o cortisol altera o metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos, especialmente diminuindo a produção de T3 reversa através da inibição da desidase tipo 1 no fígado (SAMUELS & MCDANIEL 1997; CHOPRA, 1975), além de diminuir a capacidade da proteína

responsável pelo seu transporte (*Thyroxine Binding Globulin*) (FELDMAN & NELSON, 1996).

Em indivíduos saudáveis, a administração de altas doses de glicocorticoides leva à diminuição de 50% dos níveis séricos de TSH, 19% de queda dos níveis de T3 séricos, mas nenhuma alteração significativa nos níveis séricos de T4 livre (SAMUELS & MCDANIEL, 1997)

No estudo de Mathioudakis (2012), foi demonstrado que, por ser uma deficiência secundária ao HAC, 50% dos pacientes que apresentam hipotireoidismo central recuperam a função tireoidea após a cirurgia transfenoidal. Com relação à estimulação hormonal, na doença de Cushing, a resposta do TSH à administração de TRH é diminuída (BENKER et al. 1990; VISSER & LAMBERTS, 1981).

1.3 Efeitos do HAC na homeostase hidroeletrolítica e cardiovascular

O aumento da produção endógena de cortisol no HAC pode prejudicar a função renal induzindo alterações vasculares e hemodinâmicas bem como disfunções glomerular e tubular (SMETS, 2010). Cerca de 86% dos cães com HAC apresentam hipertensão arterial e entre 44 e 46% têm proteinúria persistente mesmo após sucesso no tratamento de hipercortisolismo (ORTEGA et al., 1996). Embora existam dados percentuais de frequência dessas alterações, mecanismos subjacentes à hipertensão no HAC continuam pouco compreendidos. Há hipóteses referentes ao excesso de secreção de renina, ativação do sistema renina-angiotensina e redução das prostaglandinas vasodilatadoras (MELBY, 1989; YASUDA et al., 1994; FELDMAN & NELSON, 1996; NICHOLS, 1997).

A administração de ACTH ou GCs a curto prazo aumenta a taxa de filtração glomerular em humanos, ratos, ovelhas e cães (CONNELL et al., 1987; DAVIS & HOWELL, 1953; Wen et al., 1998; WHITWORTH et al., 1978).

A zona mais externa da glândula adrenal é a glomerulosa (ZG) que secreta mineralocorticoides, em destaque a aldosterona. Este hormônio é essencial na regulação de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺), retenção e excreção de íons pelos rins. Os glicocorticoides potencializam o comportamento natriorexigênico induzido pela aldosterona (ANTUNES-RODRIGUES, 2005) e inibem a ação da ocitocina e do ANP que são hormônios natriuréticos. O resultado dessas ações é a hipertensão. Não obstante, os glicocorticoides também desempenham papel importante na indução de alterações semelhantes às

provocadas pela ação dos mineralocorticoides na excreção renal de sódio e reforçando a ação de substâncias vasoativas (SCHIMMER & PARKER, 1996). Ortega e colaboradores (1995) demonstraram que os níveis plasmáticos de aldosterona (pré e pós administração de ACTH) estavam altos em cães com HAC hipófise-dependente, não tratados, comparados com cães saudáveis.

Os glicocorticoides podem influenciar no tônus vascular, pressão sanguínea e homeostase de eletrólitos através de sua discreta ação mineralocorticoide. De fato, o cortisol livre se liga não só aos receptores de GCs (GRs) como também aos receptores de mineralocorticoides (MRs) e sua atividade nos tecidos é mediada pela enzima microsossomal 11- β -hidroxisteroide desidrogenase (11 β -HSD) (SMETS et al. 2010). Há dois isotipos distintos de 11 β -HSD: 11 β -HSD tipo 1 (11 β -HSD1) com atividade predominantemente de converter cortisona em cortisol ou 11-dehidrocorticosterona em corticosterona, enquanto 11 β -HSD tipo 2 (11 β -HSD2) oxida cortisol ou corticosterona nos inativos cortisona ou 11-dehidrocorticosterona. Embora 11 β -HSD1 seja encontrada na maioria dos tecidos, incluindo o túbulo proximal renal, 11 β -HSD2 está preferencialmente localizada em células que expressam MRs, como no túbulo distal renal (AGARWAL et al., 1989 & ALBISTON et al., 1994). Uma vez estimulada, a ZG desencadeia a metabolização de 18-hidroxycorticosterona em aldosterona que atua diretamente nos rins a fim de manter a homeostase de Na⁺/K⁺ assim como as outras funções. A ZG é primariamente estimulada pelo sistema renina angiotensina e pelos níveis de K⁺. Apesar de fraco, ACTH exerce um sinal de estimulação para a ZG, mas nessa região não há expressão de 17 α -hidroxilase, enzima chave na síntese de cortisol (CROSS, 2011). Os glicocorticoides aumentam a taxa de filtração glomerular em animais e humanos, aumentam o volume urinário, a excreção urinária de sódio e a excreção de potássio. (HAACK et al., 1977; SUZUKI et al., 1982; BAYLIS et al., 1990).

Em concentrações fisiológicas, cortisol é convertido em cortisona pela atividade local de 11 β -HSD2, o que impede a ligação a MR. Não obstante, o excesso de cortisol pode saturar a capacidade da enzima e permitir a ligação com MRs (ULICK et al., 1992). Esta hipótese é ainda amplamente difundida mesmo diante de uma análise recente que sugere que a atividade de 11 β -HSD2 não evita a ocupação dos MRs pelos GCs em condições fisiológicas dos níveis de cortisol. Isto sugere, contudo, que 11 β -HSD2 evita a ativação de MRs e o cortisol pode ter uma ação bivalente em MRs dependendo do estado redox

intracelular (FUNDER & MIHAILIDOU, 2009). A secreção de cortisol por essa área da glândula adrenal é, portanto, muito limitada.

O HAC causa anormalidades metabólicas que determinam o aumento do risco cardiovascular não somente na fase aguda da doença, mas também por um longo período após a cura. Complicações cardiovasculares, como aterosclerose, doença coronariana, falência cardíaca e derrame em pacientes com HAC causam uma taxa de mortalidade maior que a observada na população saudável (DE LEO et al., 2010). O aumento do risco cardiovascular é devido, principalmente, a complicações como a síndrome metabólica, mas também, a alterações vasculares e cardíacas como aterosclerose e mudanças estruturais e funcionais do coração (DE LEO et al., 2010).

Os glicocorticoides parecem regular a expressão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nas células vasculares do músculo liso, o que leva ao aumento intracelular da concentração de Ca^{2+} e vasoconstrição (SMITH & SMITH, 1994). Adicionalmente, GCs podem, ainda, comprometer a atividade vasodilatadora. Há bastante evidência com relação às interações entre GCs e o sistema de óxido nítrico (NO) em humanos, bem como em ratos (KELLY et al., 2001; LOU et al., 2001 & WEN et al., 2000). Finalmente, humanos com HAC, assim como aqueles submetidos à administração de corticosteroides ou ACTH têm aumento dos níveis do peptídeo natriurético atrial (ANP), que também é sugerido na literatura como contribuição para o aumento da TFG induzida por CGs devido ao seu efeito vasodilatador na arteríola aferente (CONNELL et al., 1987; YAMAJI et al., 1988; SALA et al., 2001).

Além dos efeitos diretos dos glicocorticoides nos distúrbios cardiovasculares, a hipersecreção crônica de cortisol causa obesidade centrípeta, hipertensão arterial, tolerância à glicose diminuída e dislipidemia, o que aumenta, indiretamente, o risco de eventos cardiovasculares (TOJA et al. 2012). Concomitantemente, a hipertensão também agrava parâmetros cardíacos no HAC, e é um dos principais determinantes de hipertrofia cardíaca, mesmo após a remissão do hipercortisolismo (TOJA et al., 2012) embora o mecanismo de hipertensão induzida por GCs seja complexo e ainda não esteja completamente elucidado (SMETS et al., 2010). Concomitantemente, os efeitos dos glicocorticoides no sistema cardiovascular provocam alterações vasculares e hemodinâmicas que em partes afetam o fluxo sanguíneo renal e a função glomerular (FERRARI, 2003; MANGOS et al., 2003; WALKER, 2007). Além de favorecerem a proteinúria e alteração na densidade urinária. Reciprocamente, a insuficiência renal crônica pode ainda alterar o metabolismo do cortisol (SMETS et al. 2010). Não obstante, a

neurohipófise secreta AVP o que permite a retenção de água e concentração de urina pelos rins. A ausência de AVP resulta em *diabetes insipidus* e incapacidade de concentrar a urina (CROSS et al., 2011). Há a sugestão de que a resistência vascular renal (RVR) atua de forma crucial na patogênese da hipertensão induzida por ACTH em ratos (WEN et al., 1999).

1.4 Efeitos do HAC no metabolismo energético

Em situações de estresse, observa-se aumento de atividade do eixo HPA aumentando os níveis de glicocorticoides. Nesta situação, tal hormônio responde a essa condição acionando mecanismos catabólicos como aumento do fornecimento de glicose, via aumento da taxa de gliconeogênese, bem como lipólise e proteólise (CANALIS et al., 2002). Este mesmo efeito é observado no hipercortisolismo crônico do HAC.

O cortisol é um dos esteroides mais importantes na espécie humana já que controla o metabolismo lipídico, proteico e de carboidratos (BAUDRAND et al., 2010). A secreção excessiva de cortisol, no entanto, pode ter muitos efeitos prejudiciais sobre o corpo por causa das suas propriedades catabólicas e antagônicas à insulina (FELDMAN & NELSON, 2004). O excesso de glicocorticoides inibe a captação de glicose pelos tecidos periféricos e estimula a gliconeogênese. Nos tecidos sensíveis à insulina, os glicocorticoides atuam na cascata intracelular da insulina por mecanismos que envolvem interação com transportadores de glicose (WAJCHENBERG, 2000). Sendo assim, indivíduos que sofrem de HAC têm predisposição a desenvolver diabetes como doença concomitante (HESS et al., 2000 & PETERSON et al., 1984). A Síndrome de Cushing é caracterizada pela diminuição da tolerância à glicose, hipertensão (ASHIZAWA et al., 2006), fatores de risco cardiovascular que aumentam fortemente a morbidade e mortalidade, incluindo obesidade visceral com resistência insulínica, aterosclerose, hipertensão sistêmica, dislipidemia e devido à síntese excessiva de glicocorticoide (PIVONELLO et al., 2005).

Em relação ao metabolismo de lipídeos, o glicocorticoide tem efeito dual uma vez que, no tecido adiposo periférico, os GC reduzem a atividade da lipoproteína lipase e estimulam hormônios sensíveis à lipase, aumentando a hidrólise de triglicérides (OTTOSSON et al., 1994 & SLAVIN et al., 1994). A obesidade ocorre em mais de 80% dos casos (STEWART, 2003) com redistribuição do tecido adiposo da periferia para as áreas centrais do corpo, principalmente na região do tronco e depósitos viscerais

(PASQUALI et al., 2006; MAYO-SMITH, 1989; & REBUFFE-SCRIVE, 1988). Os glicocorticoides exercem um papel fundamental tanto na regulação do metabolismo do tecido adiposo quanto na diferenciação dos pré-adipócitos na maturação dos adipócitos (MORTON, 2008)

O abdômen penduloso é uma característica comum em cães com HAC. Este sintoma é resultante da combinação da fraqueza da musculatura abdominal, hepatomegalia, retenção de urina na vesícula e redistribuição do tecido adiposo no mesentério. Estes fatores dão ao animal o aspecto de ganho de peso, porém, esta relação entre obesidade e HAC não está bem estabelecida no cão (GILOR & GRAVES, 2011). Não obstante, a obesidade central é comum e também está associada à hipertensão, dislipidemia, resistência insulínica, diabetes e morte prematura por doença cardiovascular (BJORNTOP, 1991). O acúmulo de tecido adiposo intra-abdominal é mais associado a esses distúrbios do que o tecido adiposo subcutâneo (BUJALSKA, 1999). Além disso, para esse efeito na distribuição dos adipócitos, os glicocorticoides regulam a diferenciação das células adiposas estromais e afetam suas funções (HAUNER et al., 1989; FRIED, 1993; BRONNEGARD, 1995). Muitos desses efeitos são maiores no omento do que no tecido adiposo subcutâneo, sugerindo que os glicocorticoides exercem um papel crucial na patogênese da obesidade central (BUJALSKA et al., 1999). Todavia, os mecanismos moleculares subjacentes à regulação distinta de depósitos adiposos periféricos e centrais nos tecidos por GCs permanecem atualmente, em grande parte, desconhecidos van (RAALTE et al., 2009).

O controle de produção local de glicocorticoides depende da enzima 11 β -HSD1, a qual converte cortisona inativa em cortisol, incrementando assim a estimulação do receptor nuclear específico (DRAPER & STEART, 2005). Em paciente com obesidade central, o hipercortisolismo esplênico poderia surgir da produção de cortisol pela enzima 11 β -hidroxiesteroidesdesidrogenase tipo 1 (11 β -HSD1), que converte a cortisona inativa em cortisol ativo principalmente no fígado, mas também nos tecidos adiposos visceral e subcutâneo (WALKER & ANDREW, 2006; BAUDRAND et al., 2010). Estudos recentes com modelos roedores mostram um potencial papel patogênico de 11 β -HSD1 e hipercortisolismo esplênico na distribuição do tecido adiposo central (TOMLINSON et al., 2004). Uma explanação plausível para este fenômeno é que a obesidade está associada a alterações do metabolismo do cortisol em tecidos locais e no baço, combinado com hipercortisolismo funcional devido a alterações sutis no eixo HPA (BUJALSKA, 1997).

No tecido adiposo e fígado, a função de 11beta-HSD1 é bem conhecida, mas dados sobre seu papel no músculo esquelético são raros, embora seja bem descrito que GCs induzem atrofia muscular em diversas condições catabólicas (HASSELGREN, 1999) pela inibição da síntese proteica e indução da degradação de proteínas (BAUDRAND et al., 2010; TOMLINSON et al., 2004). A mais bem conhecida via proteolítica é o processo lisossomal. Nos músculos, também ocorrem duas vias principais de proteólise citosólica: Ca^{2+} dependente e ATP-ubiquitina dependente. As principais proteinases lisossomais (catepsinas B, H, L e D) e as proteinases cálcio dependentes (tz- e m- calpains que diferem em afinidades com Ca^{2+}) não contribuem significativamente com o aumento da proteólise em várias condições de gasto muscular, o qual resulta em aumento de proteólise (DARDEVET et al., 2012) e não exercem papel fundamental na degradação de proteínas miofibrilares (FURUNO et al., 1990). Além disso, os efeitos dos GCs na expressão do gene de proteinases lisossomais ou Ca-dependente são desconhecidos no músculo esquelético (DARDEVET et al., 2012). Em contraste, a via proteolítica ATP-ubiquitina-dependente que foi previamente bem descrita por degradar proteínas anormais e de curta duração (CIECHANOVER, 1994; RECHSTEINER, 1991) (20, 21) é presumidamente o sistema crítico responsável pelo colapso de componentes contráteis de longa duração (RECHSTEINER, 1991; FURUNO et al., 1990). Este dado foi observado no estudo de WING e GOLDBERG (1993) no qual ocorreu o aumento na expressão de ubiquitina ou de subunidades de ubiquitina e proteassoma (PRICE et al., 1994) foi relatada em músculo esquelético de ratos após tratamento com dexametasona (DARDEVET et al., 2012). Todavia, a cascata de eventos ligando GCs à estimulação de proteólise dependente de ATP-ubiquitina continua não elucidada (DARDEVET et al., 2012), bem como os mecanismos relacionados ao desgaste muscular (DARDEVET et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho visa fornecer bases para a padronização de um modelo experimental de hiperadrenocorticismos hipófise-dependente em ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliação parcial do eixo HHA (peso das adrenais, hipófise e hipotálamo; dosagem de corticosterona sérica)
- Avaliação indireta do metabolismo energético (ingestão alimentar e variação de peso corporal, peso de tecido adiposo peritoneal e fígado)
- Avaliação do equilíbrio hidroeletrolítico associado a alterações cardiovasculares: ingestão de água e salina 1,8% diária, volume urinário, vasopressina (AVP), ocitocina (OT), peso renal, peso cardíaco
- Avaliação do *status* tireoidiano: peso da glândula e dosagens plasmáticas de triiodotironina (T3), tetraiodotironina (T4) e hormônio liberador da tireotrofina (TSH)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Apreciação Bioética

O presente estudo foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ sob processo número 23083.006750/2012-60, estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Todas as manipulações experimentais foram executadas em consonância com o *Guide for the Use of Laboratory Animals*, publicado por *USA National Institutes of Health* (NIH *publication* No. 85-23, revisado em 1996).

3.2. Local

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio Janeiro em caixas de medidas padronizadas, com ração peletizada padrão Purina e água *ad libitum*, nas quais foram divididos em 3 grupos, sendo dois grupos com 5 animais e um grupo com 4. Após alcançarem o peso ideal, os animais foram redistribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais descritos no item 3.4. Para tanto, eles foram transferidos para gaiolas metabólicas com bebedouros graduados, comedouros, coletores de urina e fezes. O ambiente foi climatizado com sistema de controle do ciclo claro/escuro, iniciado o período claro às 7 horas e, o escuro às 19h de cada dia e temperatura ambiental de 25°C.

3.3. Animais

Foram utilizados 14 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos (70-80 dias), com peso variando de 225 a 305g, em número (N) de 7 para cada grupo experimental.

3.4. Grupos Experimentais

Foram utilizados 2 grupos com 7 animais em cada, submetidos aos seguintes tratamentos: Grupo controle - 0,2ml de salina por via subcutânea por dia, durante 7 dias e grupo tratado - 0,2ml (200 µg) de ACTH₁₋₂₄ sintético (Synacthen, Acetato de

Tetracosactida 0,25mg/ml, Biofutura Pharma, Itália) por via subcutânea, sendo uma única injeção diária no período entre 7 e 8 horas da manhã durante 7 dias.

3.5 Protocolo de Ingestão de Água e Alimento

Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas contendo bebedouros graduados para a medição da ingestão diária de água (volume inicial – volume final).

A ingestão de alimento foi avaliada através da pesagem da ração oferecida (valor ingerido = peso inicial – peso final).

3.6 Coleta de sangue

Após sete dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação para que fossem obtidas amostras de plasma sanguíneo em frascos com anticoagulante (heparina). O plasma foi obtido após centrifugação por 20 minutos, 3000 rotações/min a 4°C e estocado a -20°C, até o momento dos ensaios. Para determinação dos níveis de T3 e T4 por quimioluminescência e corticosterona, OT, AVP e TSH pela técnica de radioimunoensaio.

3.7 Procedimentos para dosagens hormonais

3.7.1 Extração de hormônios

AVP e OT foram extraídos do plasma com acetona e éter de petróleo: um mL de plasma foi transferido para um tubo contendo 2 ml de acetona gelada (Merck, Brasil), seguido por agitação de 30 segundos e centrifugação (2500 rpm, 25 min, 4°C); a seguir, o sobrenadante foi decantado para um tubo contendo 2 mL de éter de petróleo (Reagen, Brasil), sendo submetido a agitação e reservado durante 2 min; o sobrenadante (éter de petróleo) foi desprezado por aspiração e o líquido restante (acetona) contendo AVP e OT foi submetido ao processo de liofilização. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuspenso com 250 µL de tampão do ensaio. Por sua vez, para as dosagens de AVP e OT neurohipófisários, as neurohipófises foram homogeneizadas em 200 µL de uma solução de HCl 0,1 N; a partir de uma alíquota desse homogeneizado, foi realizada a dosagem de

proteínas pelo método de Bradford (BioRad, EUA) e, em seguida, o homogeneizado restante foi diluído na proporção de 1:20.000 para a realização dos radioimunoensaios. A extração de Corticosterona foi realizada a partir da adição de 1mL de etanol (4 °C) a 25 µL de plasma, sendo logo em seguida submetido à centrifugação (2500 rpm, 15 min, 4 °C). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e liofilizado. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuspensão com 1,5 mL de tampão do ensaio e pipetado em duplicata. Todos os procedimentos de extração foram realizados sobre gelo. Para determinar a eficiência da extração dos hormônios pelos métodos utilizados, uma quantidade de (~ 25.000 cpm) do peptídeo marcado (com 125I) foi adicionada a um mL de plasma, o qual foi submetido às extrações, como descrito acima. Os sobrenadantes e os precipitados, gerados em cada uma das etapas da extração, foram analisados no contador gama e, a partir dos valores de suas radioatividades obtidas, foi calculada a proporção do hormônio recuperado no final do processo de extração. A extração foi considerada eficiente quando a porcentagem de recuperação do hormônio marcado for acima de 90%.

A técnica de radioimunoensaio é específica usando as técnicas descritas por Elias et al., 1998; Haanwinckel et al., 1995; Gutkowska et al., 1984; Vecsei, 1979; Moreira et al., 1987; Botelho et al., 1994 para AVP, OT).

Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata.

3.8 Peso de Órgãos Relativo ao Peso Corporal

Após os animais serem submetidos à eutanásia, foram coletados e pesados outros órgãos além das glândulas adrenais. São eles: fígado, rins, coração, hipófise e hipotálamo. Todos os órgãos foram comparados na relação peso do órgão : peso corporal .

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

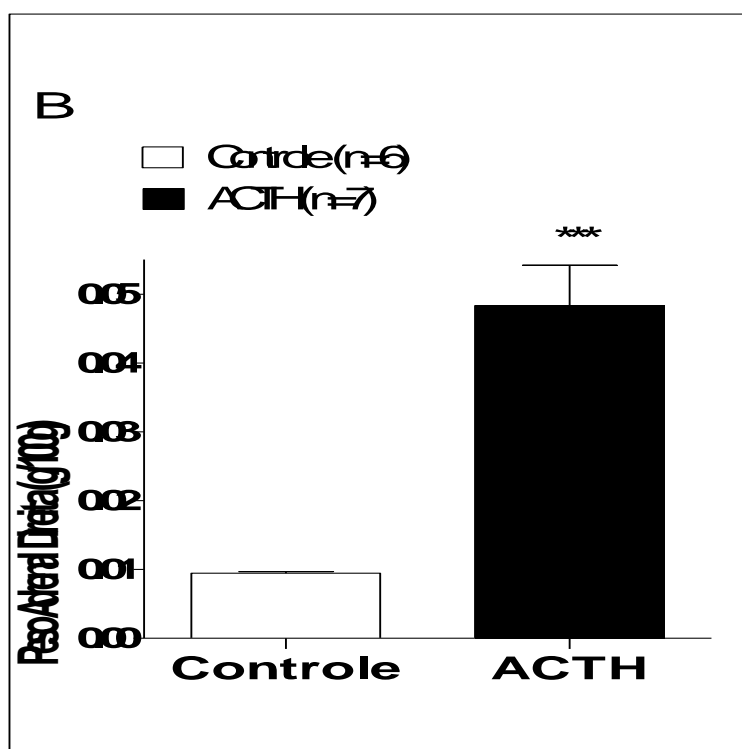
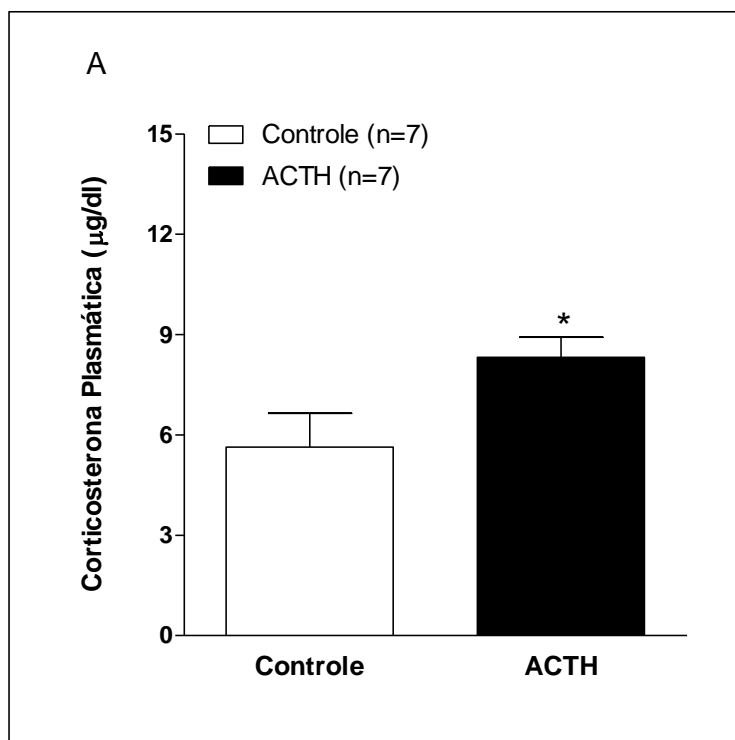
Os resultados obtidos foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais avaliadas pela análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni e teste “t” de *Student* para os dados paramétricos e pelo teste “t” de *Student* não pareado para os dados não paramétricos. Em todas as comparações o nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$.

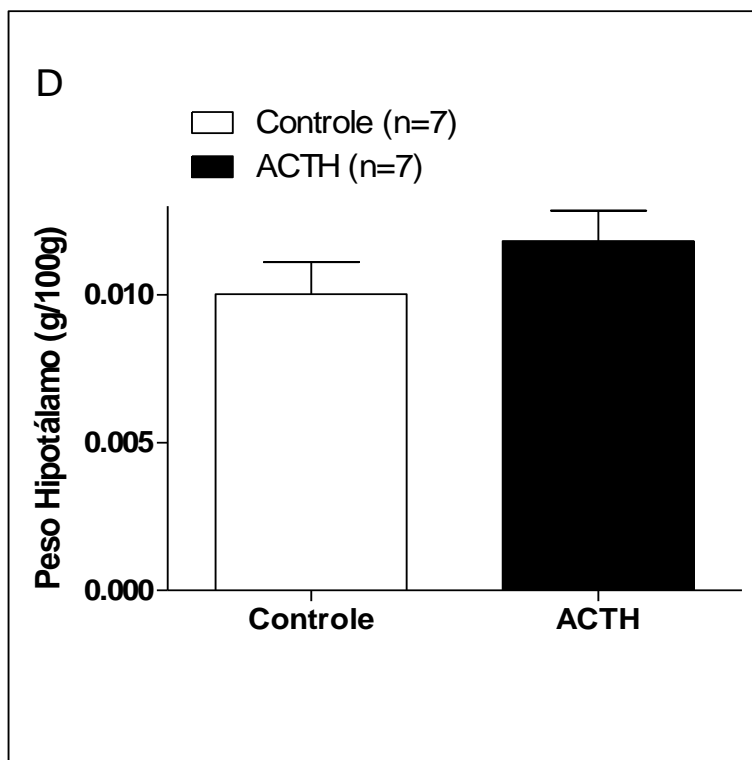
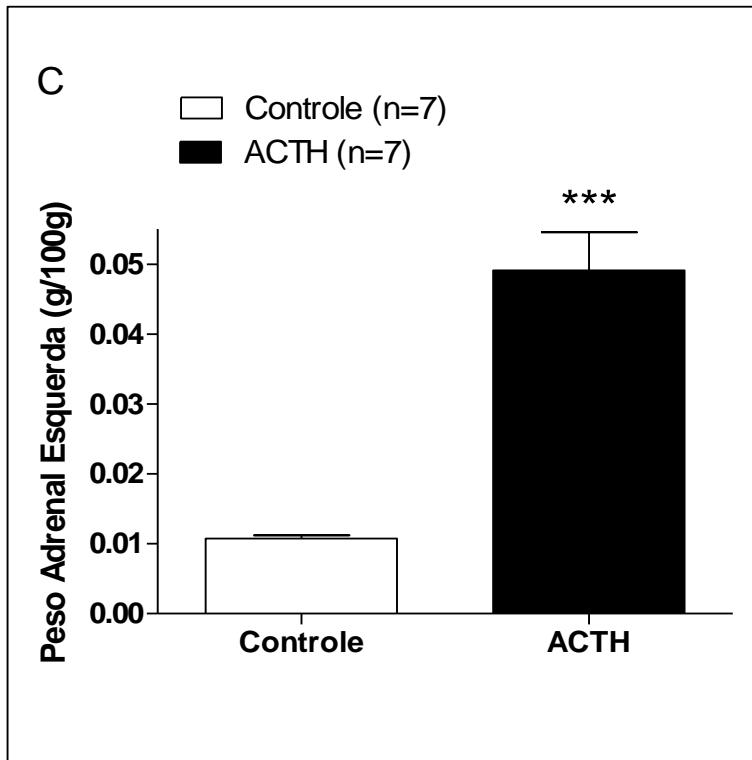
5 ORÇAMENTO

A execução do projeto foi garantida pelo apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, a FAPERJ (sob processo número: E-26/101.552/2010), bem como, por recursos provenientes do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, o CNPq (sob processo número: 300577/2009-5).

6 RESULTADOS

6.1 Efeitos da estimulação com ACTH sobre o eixo HHA em ratos





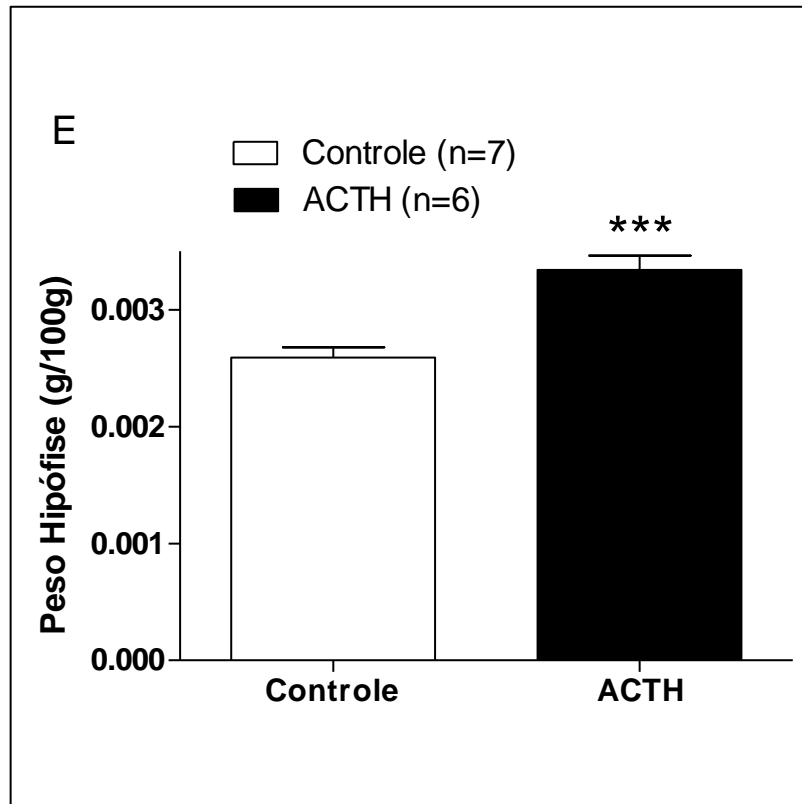
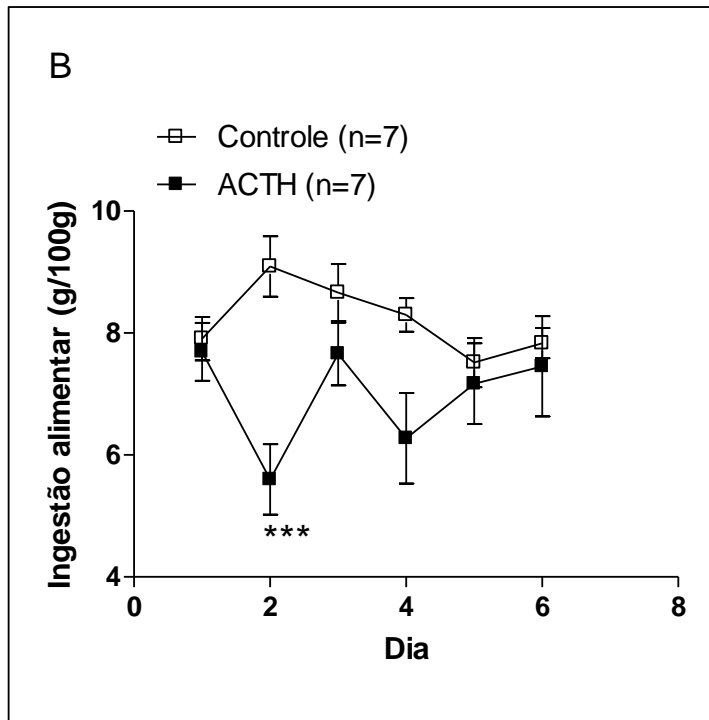
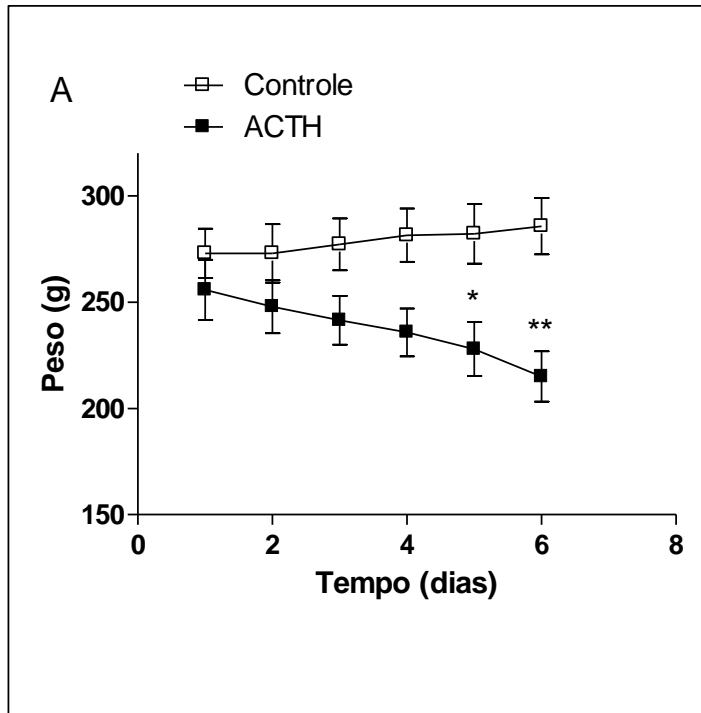


Figura 2 – Efeito da estimulação com ACTH nos níveis plasmáticos de corticosterona (Gráfico A); no peso das adrenais direita (Gráfico B) e esquerda (Gráfico C) no peso do hipotálamo (Gráfico D); e no peso da hipófise (gráfico E) - Dados apresentados em média \pm EPM * $p < 0,05$ *** $p < 0,0001$.

De acordo com os gráficos acima, nota-se que o tratamento diário com ACTH em ratos elevou significativamente os níveis plasmáticos de corticosterona ($5,63 \pm 1,01$ vs. $8,31 \pm 0,60$ $\mu\text{g/dl}$). Adicionalmente, o peso relativo das adrenais direita ($0,009 \pm 0,01$ g/100g; $0,05 \pm 0,01$) e esquerda ($0,01 \pm 0,01$ g/100g vs. $0,05 \pm 0,01$) também sofreu aumento significativo quando comparados com o grupo controle. Com relação ao peso do hipotálamo, não houve diferença expressiva entre os grupos ($0,010 \pm 0,001$ vs. $0,011 \pm 0,001$ g/100g). Em contrapartida, a análise das hipófises de ratos tratados, revelou o aumento significativo de seus pesos relativos em comparação com o grupo controle ($0,00259 \pm 0,00008$ vs. $0,00334 \pm 0,00012$ g/100g).

6.2 Efeitos da estimulação com ACTH no metabolismo energético em ratos



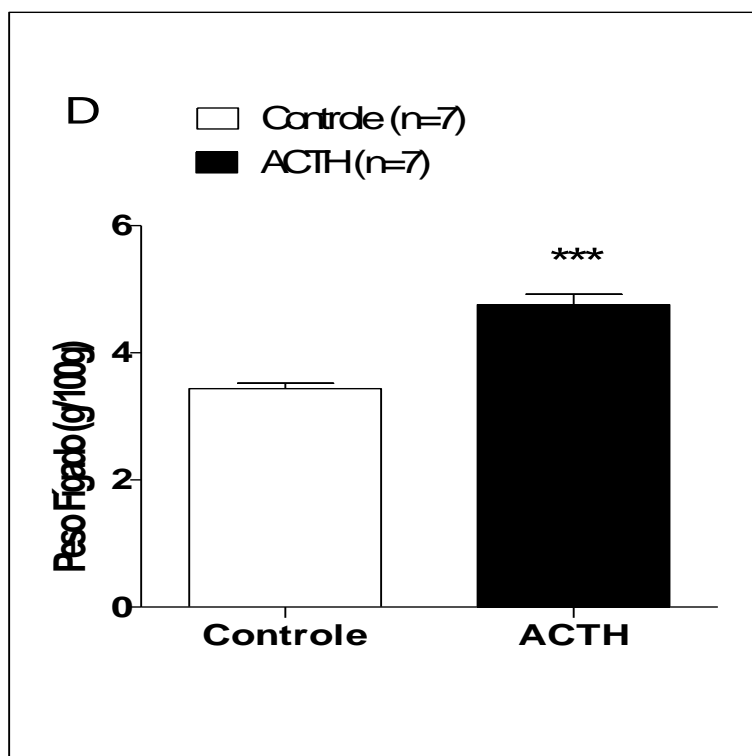
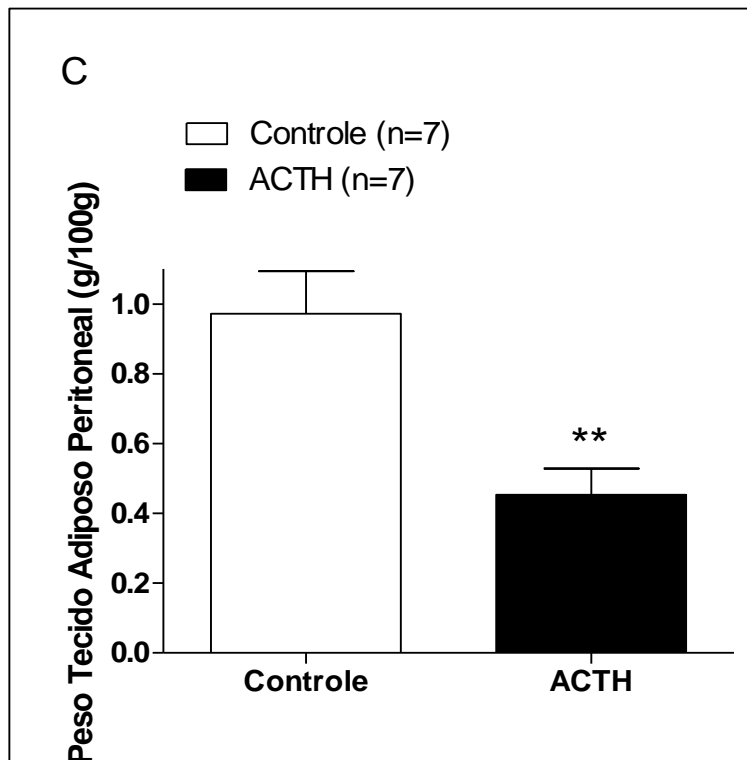
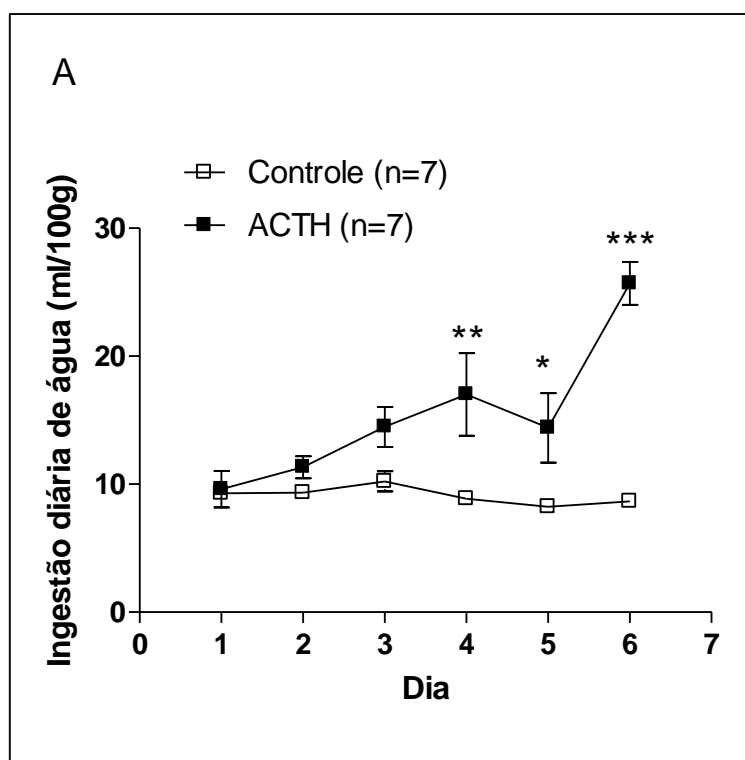
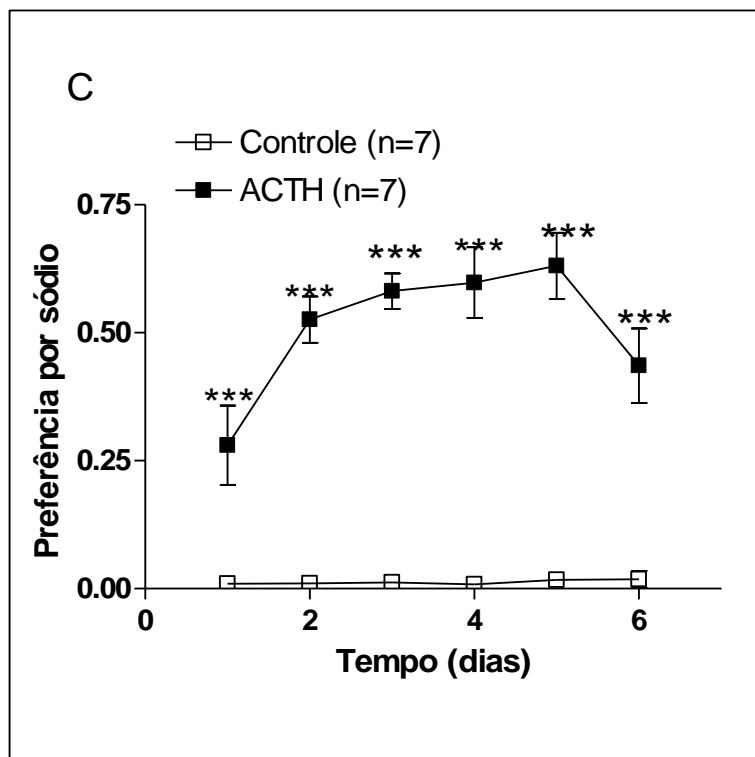
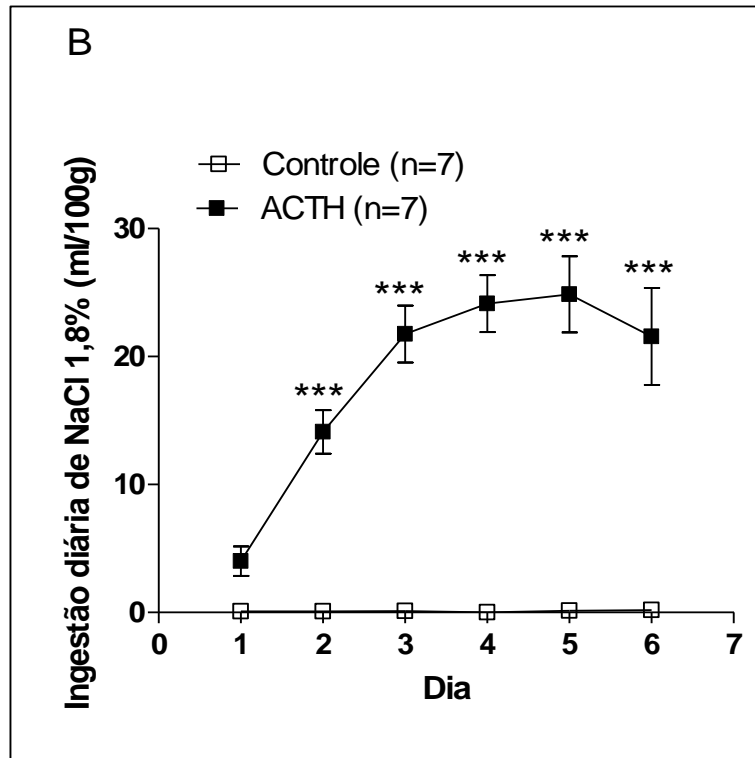


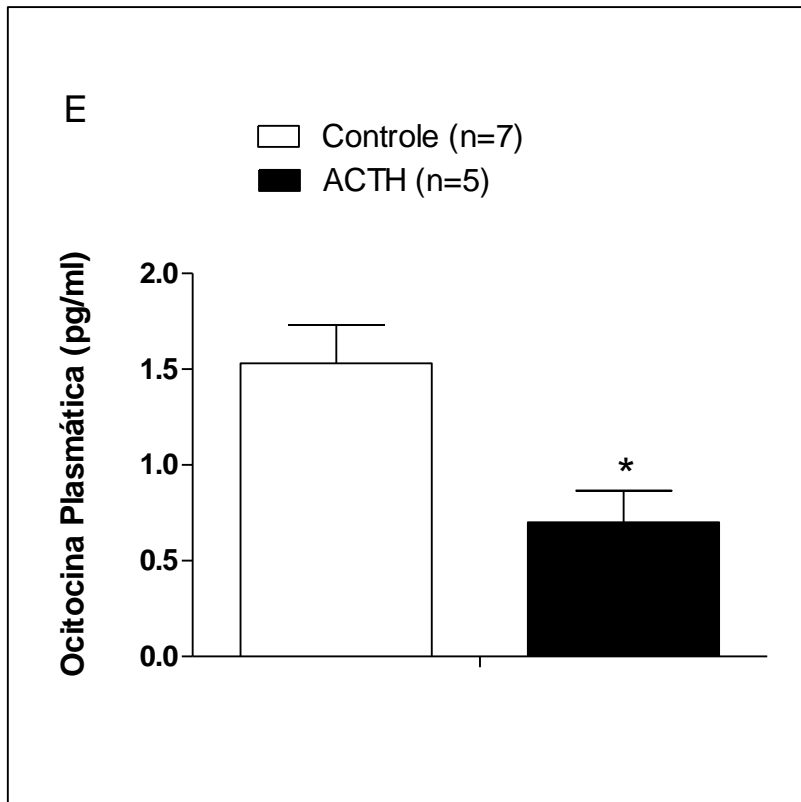
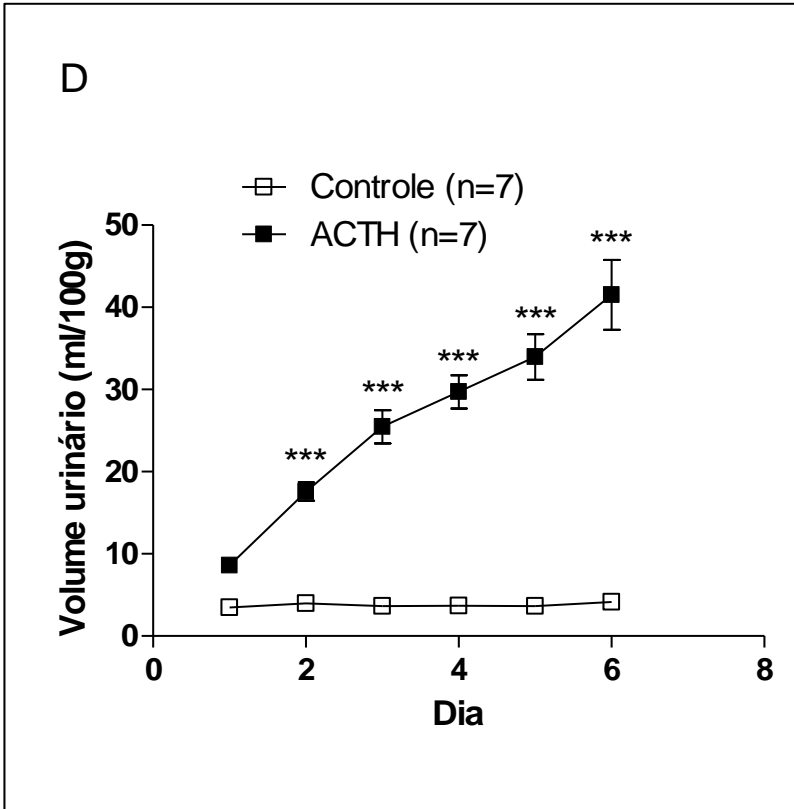
Figura 3 – Alterações decorrentes do tratamento com ACTH na variação de peso corporal dos animais (Gráfico A); na ingestão alimentar (Gráfico B); na variação de peso do tecido adiposo peritoneal (gráfico C); e na variação de peso relativo do fígado - Dados apresentados em média \pm EPM * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$.

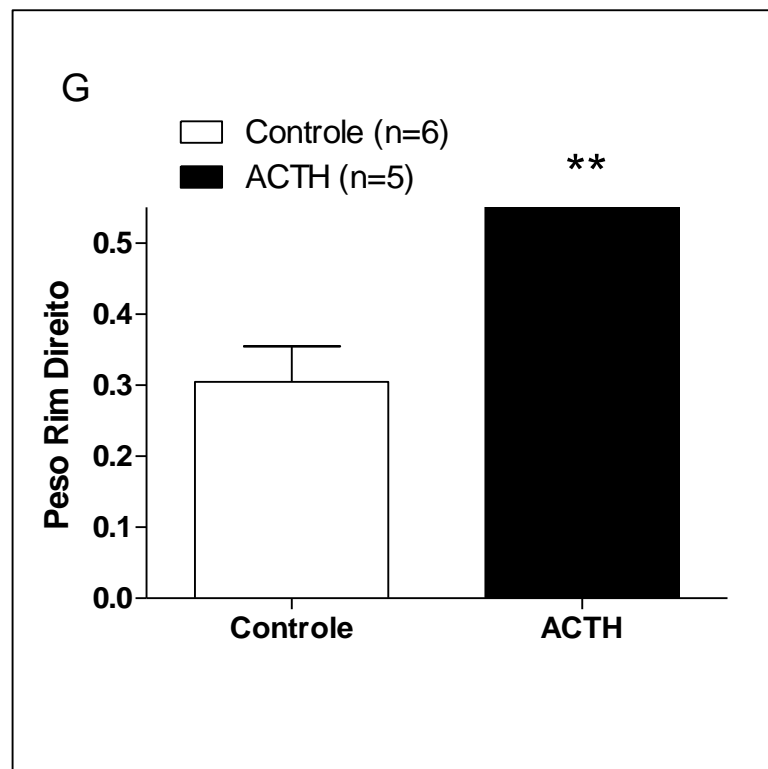
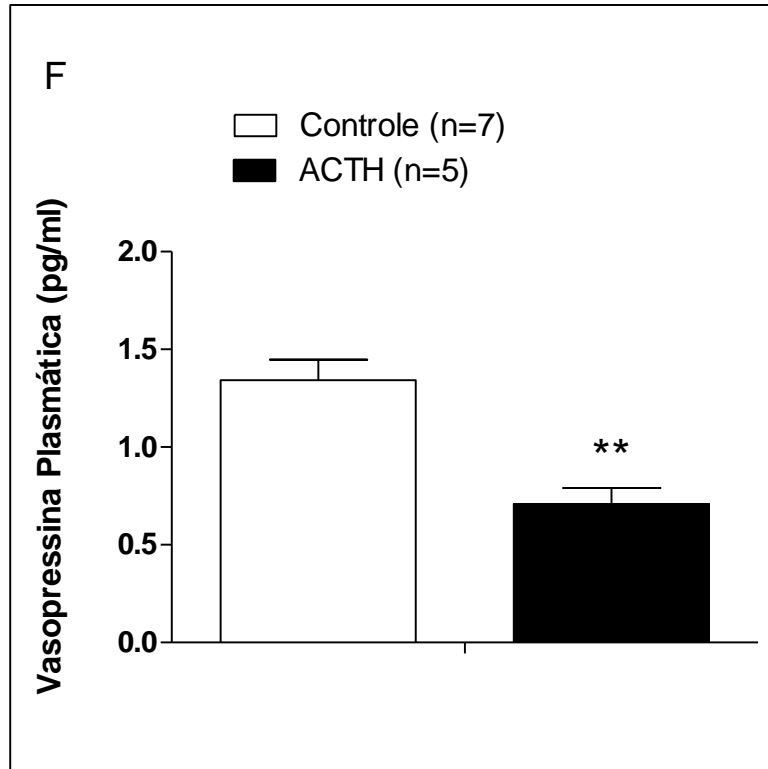
Na análise do peso corporal dos animais tratados, nota-se a perda de peso significativa nos dias 5 e 6 de tratamento com relação ao grupo controle ($282,14 \pm 14,00$ vs. $227,85 \pm 12,67$ g; $285,71 \pm 13,29$ vs. $215,00 \pm 11,80$ g). Já a apreciação da ingestão alimentar revela a queda expressiva do comportamento alimentar apenas no segundo dia de tratamento, não sendo observada esta alteração nos demais dias ($9,09 \pm 0,49$ vs. $5,59 \pm 0,57$ g/100g). Não obstante, houve diminuição do peso relativo do tecido adiposo peritoneal do grupo estimulado com ACTH em comparação com o grupo não tratado ($0,97 \pm 0,12$ vs. $0,45 \pm 0,07$ g/100g). Por outro lado, o peso relativo do fígado no grupo tratado sofreu aumento significativo quando comparado ao grupo controle ($3,43 \pm 0,08$ vs. $4,75 \pm 0,16$ g/100g).

6.3 Efeitos da estimulação com ACTH sobre o equilíbrio hidroeletrólítico









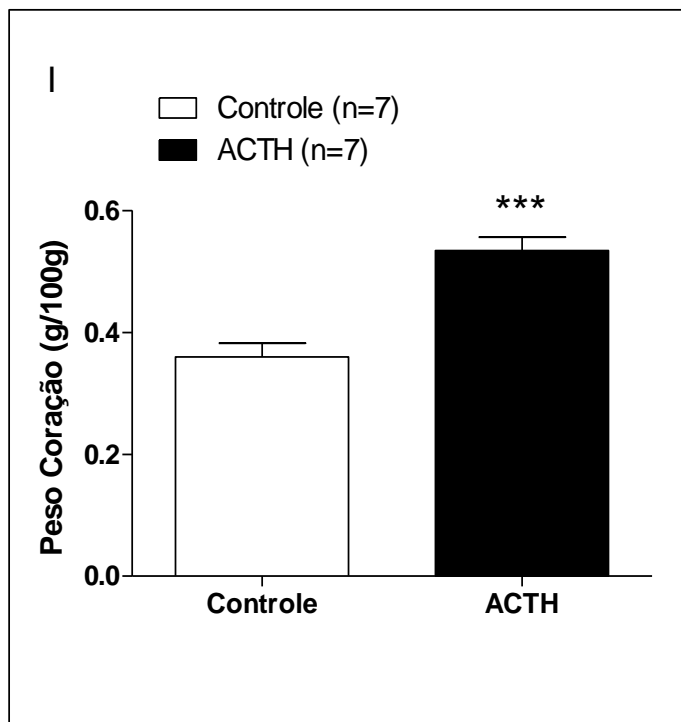
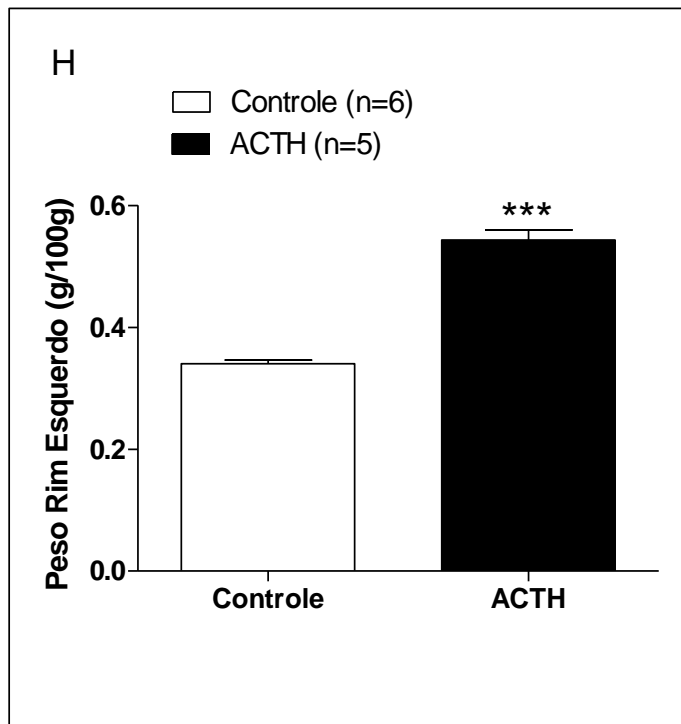
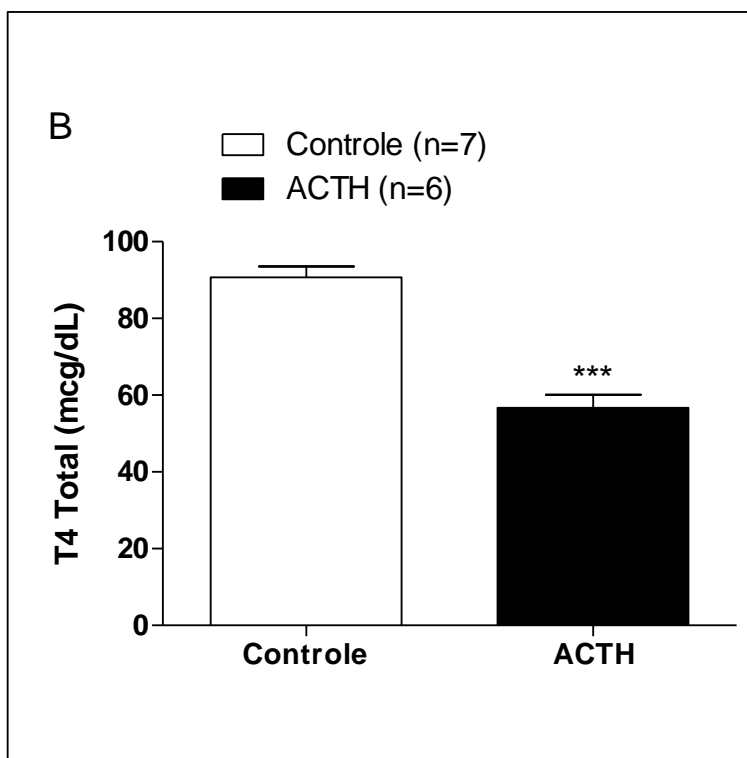
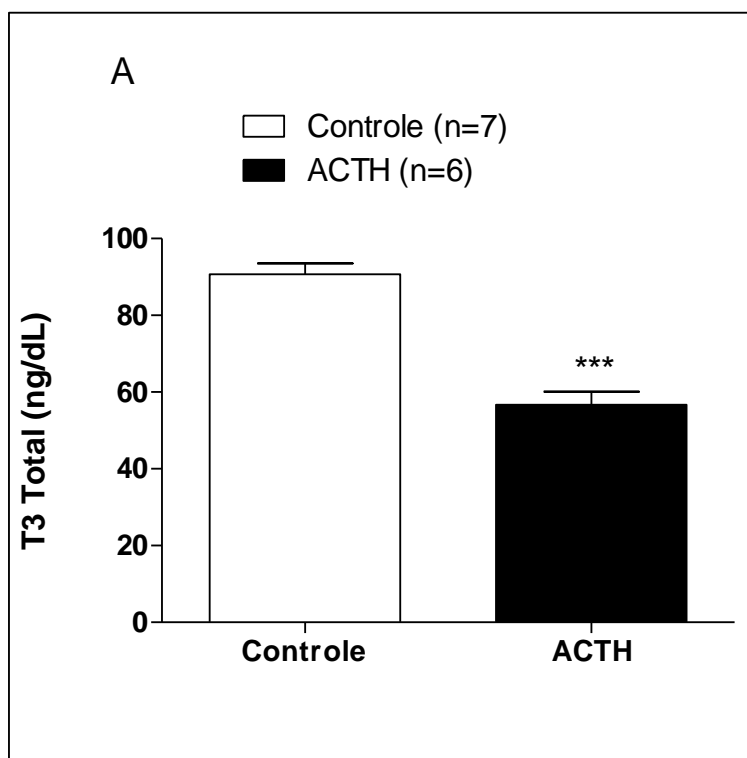


Figura 4 – Efeito da estimulação com ACTH na ingestão diária de água (Gráfico A) e salina (Gráfico B); Comparação entre os apetites por água e sal (Gráfico C: gráfico de preferência por sódio); Alteração no volume urinário produzido diariamente (gráfico D); Alteração dos níveis plasmáticos de ocitocina (Gráfico E) e vasopressina (Gráfico F); Alteração no tamanho relativo de rim direito (Gráfico G), rim esquerdo (Gráfico H) e coração (Gráfico I) - Dados apresentados em média \pm EPM * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$.

A figura 4 representa as alterações no equilíbrio hidroeletrólítico decorrentes da administração diária de ACTH em ratos. A ingestão de água torna-se significativamente aumentada no grupo estimulado com ACTH em comparação ao grupo não estimulado a partir do quarto dia de tratamento ($8,86 \pm 0,19$ vs. $17,01 \pm 3,22$; $8,22 \pm 0,26$ vs. $14,40 \pm 2,71$; $8,65 \pm 0,34$ vs. $25,69 \pm 1,67$ ml/100g). Já o aumento da ingestão de salina hipertônica revela-se expressivo desde o segundo dia de estimulação até o final do tratamento ($0,09 \pm 0,05$ vs. $14,11 \pm 1,70$; $0,11 \pm 0,07$ vs. $21,76 \pm 2,22$; $0,014 \pm 0,011$ vs. $24,139 \pm 2,227$; $0,13 \pm 0,10$ vs. $24,86 \pm 2,96$; $0,18 \pm 0,16$ vs. $21,57 \pm 3,77$ ml/100g). A partir desses dados, obteve-se o índice de preferência por sódio o qual apresentou significância ao longo de toda a estimulação com ACTH.

A análise da alteração da produção urinária comparativa entre os dois grupos em questão revelou aumento significativo no grupo tratado a partir do segundo dia de experimento ($3,99 \pm 0,28$ vs. $17,56 \pm 1,10$; $3,63 \pm 0,38$ vs. $25,46 \pm 2,01$; $3,69 \pm 0,28$ vs. $29,70 \pm 2,02$; $3,63 \pm 0,19$ vs. $33,97 \pm 2,77$; $4,14 \pm 0,31$ vs. $41,52 \pm 4,25$ ml/100g). Quanto aos níveis plasmáticos de ocitocina e vasopressina, ambos apresentaram-se significativamente diminuídos no grupo estimulado com ACTH com relação ao grupo controle ($1,53 \pm 0,19$ vs. $0,70 \pm 0,16$ pg/ml; $1,34 \pm 0,10$ vs. $0,71 \pm 0,08$ pg/ml). Em contrapartida, houve aumento do peso relativo dos rins direito ($0,30 \pm 0,04$ vs. $0,56 \pm 0,017$ g/100g) e esquerdo ($0,34 \pm 0,01$ vs. $0,54 \pm 0,02$ g/100g), além do coração ($0,36 \pm 0,02$ vs. $0,53 \pm 0,02$) no grupo tratado.

6.4 Efeitos da estimulação com ACTH sobre o *status* tireoidiano



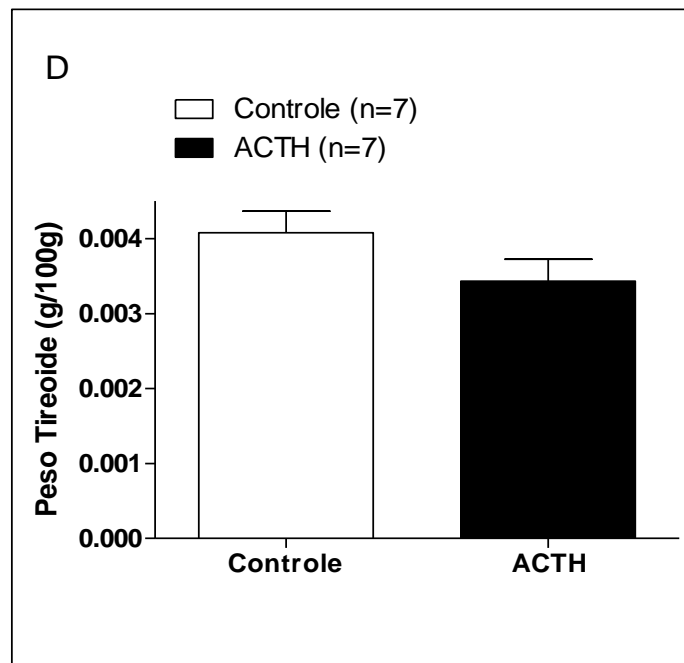
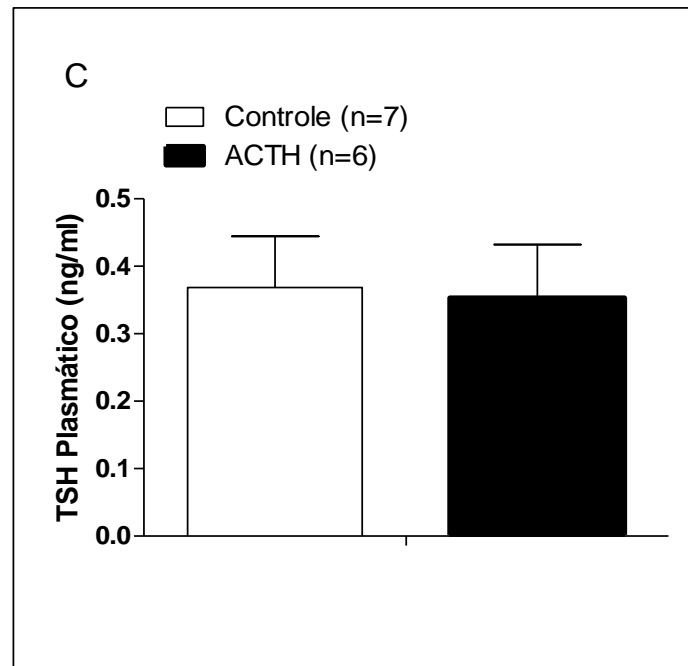


Figura 5 – Níveis de T3 (Gráfico A), T4 (Gráfico B) e TSH (Gráfico C) após o tratamento diário com ACTH; Variação de peso relativo da tireoide em ratos estimulados com ACTH (Gráfico D) - Dados apresentados em média \pm EPM *** $p < 0,0001$.

O *status* tireoidiano após o tratamento diário com ACTH foi verificado com resultado significativo de queda tanto nos níveis de T3 como de T4. Por outro lado, a estimulação do eixo HHA dos animais tratados demonstrou-se insignificante com relação ao nível de TSH e peso da tireoide.

7 DISCUSSÃO

7.1 Efeitos da estimulação com ACTH sobre o eixo HHA em ratos

De acordo com os resultados apresentados sobre as alterações no eixo HHA, observamos o aumento significativo dos níveis plasmáticos de corticosterona nos animais submetidos à estimulação diária com ACTH por ser este polipeptídeo um estimulador direto do eixo e, dessa forma, exercer potente estímulo no córtex adrenal resultando no aumento da liberação de corticosterona (BUCKLEY & SCHATZBERG, 2005). Este efeito estimulador do córtex adrenal leva ao aumento desta região que promove o ganho de peso deste órgão observado claramente nos resultados obtidos o que está de acordo com a literatura que cita o hiperadrenocorticismos dependente da hipófise cursando com hiperplasia adrenocortical bilateral (MULLER & KIRK, 1996). O aumento da adrenal é tão significativo que atualmente a abordagem laparoscópica da adrenal em humanos é o procedimento de escolha para o tratamento cirúrgico de pacientes com síndrome de Cushing ACTH dependente (YOUNG & THOMPSON, 2007). Adicionalmente, no hipotálamo, o estresse crônico geralmente aumenta a expressão de mRNA de CRH e AVP no PVN (DEGOEIJ et al., 1991, 1992b; IMAKI et al., 1991; HERMAN et al., 1995; PREWITT & HERMAN, 1997), em contrapartida, no HAC hipófise-dependente estes hormônios estão inibidos devido ao *feedback* negativo dos glicocorticoides, sendo assim, este é um dos fatores determinantes para sugerir este protocolo como adequado como base para o modelo de HAC hipófise dependente e diferencia-lo de um modelo de estresse.

Estudos recentes demonstram que o hipercortisolismo é capaz de estimular lactotrofos em humanos (LENNARTSSON & JONSDOTTIR, 2011) corroborando testes *in vitro* que também comprovaram a estimulação de lactotrofos por ação de glicocorticoides (FU, X. & POTTER T.E., 2004), e, dessa forma, sugere-se que o aumento do peso das hipófises dos animais tratados em comparação com o grupo controle possa ser reflexo desta estimulação, uma vez que, gonadotrofos sofrem efeitos inibitórios por ação dos glicocorticoides.

O hipotálamo é uma estrutura diencefálica representada por menos de 1% da massa cerebral, que controla a maioria das funções vegetativas e endócrinas do organismo. Com relação à avaliação macroscópica do hipotálamo não houve diferença significativa, o que parece estar associado ao tamanho das células que compõem a estrutura neural. Além

disso, culturas primárias hipotalâmicas são difíceis de serem mantidas e são populações heterogêneas de células neuronais e gliais e muitas vezes contêm um número mínimo neurônios secretores de peptídeos (MAYER et al., 2009), com isso alterações no eixo não são detectadas ao nível macroscópico como demonstrado no resultado comparativo do peso hipotalâmico entre os grupos experimentais.

7.2 Efeitos da estimulação com ACTH no metabolismo energético

Em termos de homeostase energética, os eixos HHT e HHA representam o maior sistema endócrino que participa da regulação do balanço energético (SPIEGELMAN & FLIER, 2001) e alterações nesses dois eixos estão associadas a diversos sintomas, incluindo variações no peso corporal (SPIEGELMAN & FLIER, 2001). Dessa forma, respostas ao estresse podem variar o grau de ativação do eixo HPA e podem estimular tanto vias orexigênicas ou anorexigênicas, bem como induzir alterações em leptina e insulina, regulando assim a ingestão alimentar (MANIAM & MORRIS, 2012). Além disso, mesmo após a exposição ao estresse, podem ocorrer efeitos a longo prazo na ingestão alimentar e no peso corporal, pois esses parâmetros são dependentes do fator estressor (MANIAM & MORRIS, 2012). A ativação de CRH e de receptores MC4 exerce efeito anorexigênico (ANTUNES-RODRIGUES, 2005), embora o CRH não seja tão potente em reduzir a ingestão alimentar (MANIAM & MORRIS, 2012). Já os GCs desempenham papel importante no controle do comportamento alimentar, induzindo a liberação de NPY e inibindo a liberação de CRH no hipotálamo, contudo, o efeito orexigênico dos GCs podem ser anulados pela leptina (CAVAGNINI et al., 2000) que também é ativada por ação de glicocorticoides. Dessa forma, a estimulação do apetite e da expressão de leptina pela ação dos GCs conflita com a inibição da ingestão alimentar e sugere que os GCs reduzem a sensibilidade à leptina (SOLANO & JACOBSON, 1999). Sendo assim, este fato poderia explicar em parte o efeito anorexigênico observado no segundo dia de tratamento e o posterior aumento da ingestão alimentar, retornando para níveis que não diferem significativamente do grupo controle em apenas sete dias de tratamento com ACTH. Outrossim, podemos sugerir a ação direta de ACTH nas células β pancreáticas, induzindo a liberação de insulina. Este efeito, poderia iniciar o estado de saciedade a curto prazo, como observado em apenas um dia de tratamento. Outra hipótese que podemos propor relaciona o hormônio orexígeno grelina, visto que estudos realizados

por Otto e colaboradores (2004) demonstraram que o hipercortisolismo conduz à diminuição significativa nos níveis plasmáticos de grelina em seres humanos, indicando um mecanismo de *feedback* possível entre a secreção de grelina gástrica e a atividade do eixo (HPA). O hormônio grelina é um peptídeo orexígeno e adipogênico predominantemente produzido e secretado pelo estômago que tem sido demonstrado como promotor do aumento da ingestão de alimentos, resultando em balanço energético positivo (NAKAZATO et al. 2001), bem como pode representar um mediador da transdução de alterações na ingestão de alimentos para as redes reguladoras no sistema nervoso central que controla a homeostase energética (COWLEY et al. 2003). Tal achado nos permite sugerir que o tratamento prolongado como exemplo de 14 dias poderia demonstrar o possível aumento da ingestão alimentar. Outra alteração importante decorrente da estimulação crônica com ACTH é a hepatopatia por esteroide e consequente hepatomegalia como demonstrado nos resultados deste experimento corroborando dados da literatura. Esta alteração é descrita por alguns autores como vacuolização centrolobular, acúmulo de glicogênio perivacuolar entre hepatócitos e necrose centro lobular focal (GILPR & GRAVES, 2011; ROGERS & RUEBNER, 1977); macroscopicamente, as alterações encontradas nos fígados de animais cronicamente estimulados com ACTH corroboram dados da literatura como a observação do órgão aumentado de tamanho e friável (FELDMAN, 2004).

Embora esteja claro que os GCs são essenciais para a diferenciação dos adipócitos (HAUNER et al., 1987), o seu impacto sobre muitos dos processos que regulam a acumulação de lipídios nos adipócitos não foram exploradas em detalhe. Com relação ao peso do tecido adiposo peritoneal, estudos relataram que, apesar de não ter sido estatisticamente significante, houve diminuição da atividade de lipoproteinalipase em animais com HAC com relação ao grupo controle, bem como o peso dos adipócitos que foi substancialmente menor (DIGITO et al., 1990). A administração crônica de GCs pode interferir na regulação da expressão de genes catabólicos, levando a uma série de efeitos colaterais graves como ganho de peso, hiperglicemia e osteoporose (CANALIS et al., 2002). Além disso, o excesso de GCs tem sido associado a observações clínicas como a síndrome metabólica. Dessa forma, a perda de peso observada nos animais tratados pode estar relacionada ao efeito agudo, sugerindo que este protocolo possa ser a fase inicial da doença, uma vez que, não foram observados sintomas clínicos característicos do HAC crônico como ganho de peso devido à obesidade centrípeta. É importante destacar que a

redução do peso corporal dos animais submetidos ao tratamento com ACTH também pode estar associada à perda de volume pela produção urinária aumentada. Desta forma, fica claro que as causas para cada efeito observado são diversas e devem ser somadas para justificar os resultados obtidos neste estudo.

7.3 Efeito da estimulação com ACTH na homeostase hidroeletrólítica e cardiovascular

No presente estudo, houve redução significativa dos níveis plasmáticos de AVP o que pode ser explicado devido ao *feedback* negativo do eixo HHA, pois este hormônio é secretagogo de ACTH (ANTUNES-RODRIGUES, 2005; JACOBSOB, 2005; WHITNALL, 1993; ANTONI, 1986), ou seja, em níveis elevados de ACTH, como no modelo proposto, AVP sofre ação inibitória. Devido a esta redução, é também observada a poliúria bem definida ao longo do tratamento, decorrente, da diabetes *insipidus* central concomitante ao hipercortisolismo somada a outros possíveis fatores como aumento da taxa de filtração glomerular e ação do peptídeo natriurético atrial. Todavia, estas duas sugestões da literatura seguem sem comprovação, sendo a diabetes *insipidus* central a causa mais bem fundamentada da poliúria observada no HAC (FELDMAN, 2004). Como consequência do aumento da diurese, observamos polidipsia compensatória para a reposição volumétrica. Podemos ainda sugerir uma possível ação da ANG II centralmente caracterizando um potente comportamento dipsogênico. Esse efeito é decorrente da ação da ANG II em receptores AT1 localizados no órgão subfornical (SFO) e no órgão vascular da lâmina terminal (OVLT). Esse efeito da ANGII circulante é possível por essas estruturas cerebrais serem desprovidas de barreira hematoencefálica. Adicionalmente, estudos demonstraram que o aumento das concentrações circulantes de ANG II e glicocorticoides aumenta a expressão de receptores AT1 no núcleo arqueado (ARC) dorsomedial (CASTREN & SAAVEDRA, 1988) e, embora neste protocolo experimental não tenha sido realizada a mensuração plasmática de ANG II, é possível propor que tais níveis plasmáticos estejam aumentados tendo em vista o aumento da ingestão hídrica observada neste estudo (ANTUNES-RODRIGUES, 2005). Além disso, observou-se um potente efeito natriorexigênico possivelmente relacionado com a ação de OT, uma vez que estudos avaliando efeitos de OT em modelos de dieta hipossódica (MECAWI & ANTUNES-RODRIGUES, 2012) e de expansão de volume (RUGINSK et al., 2007) demonstraram que este hormônio pode ser destacado pela sua ação inibitória ao

apetite por sódio. Esta ação descrita na literatura corrobora o resultado de níveis plasmáticos de OT reduzidos no modelo estudado, bem como o aumento da ingestão de salina hipertônica no grupo tratado com relação ao grupo controle. Adicionalmente, o hipercortisolismo provoca natriurese agravando a preferência por sódio com relação a ingestão hídrica.

Como podemos observar, há um aumento significativo do peso renal tanto esquerdo como direito que pode estar vinculado à ação do GCs que elevam a taxa de filtração glomerular em animais e humanos, aumentando, também o volume urinário e excreção urinária de sódio e a excreção de potássio. (BAYLIS et al 1990; SUZUKI et al 1982; HAACK et al., 1977). É interessante observar que no rim esquerdo o aumento é ainda mais significativo.

O desequilíbrio hidroeletrólítico inerente ao hipercortisolismo crônico cursa com hipertensão arterial que associada à obesidade central e dislipidemia (BJORNTOP, 1991) favorece o surgimento de doenças cardiovasculares, tendo destaque a hipertrofia ventricular esquerda que provoca ganho de peso cardíaco corroborando dados observados no presente estudo (TOJA et al., 2012).

7.4 Efeito da estimulação com ACTH na função tireoidiana

O hipotireoidismo primário apresenta queda nos níveis dos hormônios tireoidianos e o TSH pode estar aumentado (Biondi, 2012) ou dentro dos padrões de referência. Todavia, num estado de hipercortisolismo como o induzido neste estudo, o hipotireoidismo é central e secundário e, desta forma, os níveis plasmáticos de TSH não sofreram alteração significativa, apesar dos níveis de T3 e T4 estarem abaixo da referência para a espécie. Estes dados corroboram estudos prévios que demonstram que o hipotireoidismo presente em animais submetidos ao hipercortisolismo crônico trata-se de um estado secundário e transitório e, portanto, dependente dos altos níveis de GCs (neste estudo, o hipercortisolismo é endógeno devido ao estímulo com ACTH, porém sabe-se que a iatrogenia também leva ao estado de eutireoideo doente). O indivíduo submetido ao processo de inibição do eixo HPT de forma secundária é também conhecido como eutireoideo doente. Tais fatos podem ser explicados pelo estudo de Kakucska e colaboradores (1995) que sugerem que os glicocorticoides são capazes de diminuir a biossíntese e liberação de TRH nos neurônios hipofisiotróficos do PVN e assim

desencadearem a inibição do eixo HPT dando origem ao estado transitório e dependente do fator causador, neste caso, o hipercortisolismo crônico. Porém em nosso trabalho, não foram observadas alterações com relação ao TSH no grupo tratado com ACTH, tal achado pode estar relacionado à responsividade da glândula tireoideia ao TSH, visto que não foram observadas diferenças significativas com relação ao peso da tireoide. Estudos relatam que os GCs podem diminuir a expressão do receptor para TSH e com isso interferir na síntese dos HTs (ETTINGER, 2004). Além disso, o TSH também sofre efeito inibitório por ação dos glicocorticoides, caracterizando assim, diversos fatores como determinantes para o desencadeamento do hipotireoidismo dentre os quais também é possível incluir a diminuição das ligações entre HTs e proteínas carreadoras por ação dos glicocorticoides, bem como a diminuição da desiodação periférica de T4 em T3 (FELDMAN, 2004).

8 CONCLUSÃO

As alterações do eixo HHA demonstradas no grupo de animais tratados com ACTH são compatíveis com os efeitos decorrentes do hipercortisolismo. Tais alterações diferem das propostas de modelos experimentais de estresse, que é o principal diagnóstico diferencial. Isto foi evidenciado com a redução dos níveis plasmáticos de AVP. Além disso, podemos sugerir a possível diminuição dos níveis de CRH por este peptídeo ser secretagogo de ACTH.

Com relação ao metabolismo energético, observamos algumas alterações não compatíveis com às observadas clinicamente em um animal com HAC hipófise dependente. Estes dados sugerem que este modelo experimental seja representativo da fase inicial da doença e, portanto, estudos com protocolo prolongado tornam-se necessários para esclarecer esta questão relacionada ao tempo de estimulação do eixo HHA e os mecanismos envolvidos no balanço energético.

O modelo experimental proposto sugere o efeito ativador do sistema renina angiotensina caracterizando o desequilíbrio hidroeletrolítico com consequências relacionadas também com a pressão arterial.

O estado de eutireóideo doente observado claramente nos resultados obtidos corrobora a literatura referente ao hipercortisolismo.

Nossos resultados foram compatíveis com dados observados na endocrinopatia em questão. Portanto, podemos sugerir este protocolo como base para a determinação de um modelo de HAC hipófise dependente.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL A.K., MONDER C., ECKSTEIN, B., WHITE P.C. **Cloning and expression of rat cDNA-encoding corticosteroid 11-beta-dehydrogenase** J. Biol. Chem., 264 (1989), pp. 18939–18943

ALBISTON, V.R. OBEYESEKERE, R.E. SMITH, Z.S. KROZOWSKI **Cloning and tissue distribution of the human 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-2 enzyme** Mol. Cell. Endocrinol., 105 (1994), pp. R11–R17

ALKEMADE A, UNMEHOPA UA, WIERSINGA WM (2005) **Glucocorticoids decrease thyrotropinreleasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 90(1):323-327

ANTONI FA. 1986. **Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: Advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor.** Endocr Rev 7(4): 351-378.

ANTUNES-RODRIGUES J, MOREIRA AC, KAGOHARA, LL, de Castro, M. **Neuroendocrinologia básica e aplicada.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.SA, 2005

ARAMPATZIS S, KADEREIT B, SCHUSTER D, BALAZS Z, SCHWEIZER RA, FREY FJ, LANGER T, ODERMATT A. **Comparative enzymology of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from six species.** J Mol Endocrinol. 2005 Aug;35(1):89-101.

ASHIZAWA N, TAKAGI M, SETO S, SUZUKI S, YANO K. **Serum adiponectin and leptin in a patient with Cushing's syndrome before and after adrenalectomy.** Intern Med. 2007;46(7):383-5. Epub 2007 Apr 2.

BAYLIS, C.; HANDA, R.K.; SORKIN, M. **Glucocorticoids and control of glomerular-filtration rate.** Semin Nephrol, 10: 320–329, 1990.

BENKER G, RAIDA M, OLBRICHT T, WAGNER R, REINHARDT W & REINWEIN D **TSH Secretion in Cushing's syndrome: relation to glucocorticoid excess, diabetes, goiter, and the 'sick euthyroid syndrome'.** Clinical Endocrinology 1990 33 777–786.

BAUDRAND R, CARVAJAL CA, RIQUELME A, MORALES M, SOLIS N, PIZARRO M, ESCALONA A, BOZA C, PÉREZ G, DOMÍNGUEZ A, ARRESE M, FARDELLA CE. **Overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in hepatic and visceral adipose tissue is associated with metabolic disorders in morbidly obese patients.** Obes Surg 2010;20: 77-83.

BRONNEGARD M., REYNISDOTTIR S., MARCUS C., STIERNA P., ARNER P. **Effect of glucocorticoid treatment on glucocorticoid receptor expression in human adipocytes** J t

BUCKLEY, T. M & A. F. SCHATZBERG, A. F. **Review: on the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders,”** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 90: 3106–3114, 2005.

BUJALSKA, I.J., KUMAR, S., STEWART, P.M. **Does central obesity reflect “Cushing's disease of the omentum”?** The Lancet Volume 349, Issue 9060, 26 April 1997, Pages 1210–1213

CANALIS, E.; PEREIRA, R.C & DELANY, A. M. **Effects of glucocorticoids on the skeleton,** J. Pediatr. Endocrinol. Metab, 15: 1341, 2002.

CASTREN, E; SAAVEDRA, JM **Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus subfornical organ** Endocrinology 122: 370-372, 1988

CHOPRA IJ, WILLIAMS DE, ORGIAZZI J. (1975) **Opposite effects of dexamethasone on serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3) and 3,3',5'-triiodothyronine (T3).** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 41(5):911-920.

CHROUSOS, G. P.; CHARMANDARI, E & KINO, T. **Glucocorticoid action networks – an introduction to systems biology.** J. Clin Endocrinol Metab, 89: 563–564, 2004

CIECHANOVER, A. 1994. **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway.** Cell. 79:13-21.

CONNELL JMC, WHITWORTH JA, DAVIES DL, RICHARDS AM, FRASER R **Hemodynamic, hormonal and renal effects of adrenocorticotrophic hormone in sodium-restricted man** J. Hypertens., 6 (1988), pp. 17–23

CROSS E., MORELAND R., WALLACK S. Feline Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism and Insulin Resistance Due to a Plurihormonal Adenoma Topics in Companion Animal Medicine 2011

DARDEVET D, SORNET C, TAILLANDIER D, SAVARY I, ATTAIX D, GRIZARD J. **Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging.** J Clin Invest. 1995 November; 96(5): 2113–2119.

DAVIS JO, HOWELL DS **Comparative effect of ACTH, cortisone and DCA on renal function, electrolyte excretion and water exchange in normal dogs** Endocrinology, 52 (1953), pp. 245–255.

DEGOEIJ DC, JEZOVA D, TILDERS FJ. 1992b. **Repeated stress enhances vasopressin synthesis in CRF neurons in the paraventricular nucleus.** Brain Res 577: 165-168.

DE GOEIJ DC, KVETNANSKY R, WHITNALL MH, JEZOVA D, BERKENBOSCH F. 1991. **Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats.** *Neuroendocrinology* 53(2): 150-159.

DE KLOET ER, JOËLS M, HOLSBOER F. **Stress and the brain: from adaptation to disease.** *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jun;6(6):463-75.

DE LEO M, PIVONELLO R, AURIEMMA RS, COZZOLINO A, VITALE P, SIMEOLI C, DE MARTINO MC, LOMBARDI G, COLAO A. **Cardiovascular disease in Cushing's syndrome: heart versus vasculature.** *Neuroendocrinology.* 2010;92 Suppl 1:50-4. Epub 2010 Sep 10.

DE MARCO, V. **Advances in the diagnosis and management of canine Hyperadrenocorticism,** Faculty of Universidade Guarulhos, Pompeia Veterinary Hospital Endocrinologist, 2009.

DINAN, T. C. **Glucocorticoids and the genesis of depression illness. A psychological model.** *Br J Psychiatry,* 164:265-371, 1994.

DRAPER N, STEWART PM. **11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action.** *J Endocrinol* 2005; 186: 251-7

FELDMAN EC, NELSON RW, PEDERSEN D. **Canine hyperadrenocorticism (Cushing's syndrome),** In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.* Philadelphia: Saunders; 2004

FERRARI P., M.G. BIANCHETTI M.G., SANSONNENS A., FREY F.J. **Modulation of renal calcium handling by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2** *J. Am. Soc. Nephrol.,* 13 (2002), pp. 2540–2546

FINDLING JW, RAFF H. Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. Endocrinol Metab Clin North Am. 2005 Jun;34(2):385-402, ix-x.

FRIED SK, RUSSELL CD, GRAUSO NL, BROLIN RE Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men J Clin Invest, 92 (1993), pp. 2191–2198

FUNDER JW, MIHAILIDOU AS Aldosterone and mineralocorticoid receptors: clinical studies and basic biology Mol. Cell. Endocrinol., 301 (2009), pp. 2–6

FURUNO, K., M. N. GOODMAN, AND A. L. GOLDBERG. 1990. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. J. Biol. Chem. 265:8550-8557.

GILOR C, GRAVES TK. Interpretation of laboratory tests for canine Cushing's syndrome. Top Companion Anim Med. 2011 May;26(2):98-108.

GUARALDI F, SALVATORI R Cushing syndrome: maybe not so uncommon of an endocrine disease. J Am Board Fam Med. 2012 Mar;25(2):199-208

GILLESPIE CF, NEMEROFF CB. Hypercortisolemia and depression. Psychosom Med. 2005 May-Jun;67 Suppl 1:S26-8.

HAACK, D.; MOHRING, J.; MOHRING, B.; PETRI, M & HACKENTHAL, E. Comparative study on development of corticosterone and DOCA hypertension in rats. Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol, 233: 403–411, 1977.

HAUGEN BR. (2009) Drugs that suppress TSH or cause central hypothyroidism. Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism. 23(6):793-800.

HAUNER H, ENTENMANN G, WABITSCH M, GAILLARD D, AILHAUD G, NEGREL R, AND PFEIFFER EF Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of

human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium J Clin Invest, 84 (1989), pp. 1663–1670

HERMAN JP, ADAMS D, PREWITT CM. 1995. **Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm.** Neuroendocrinology 61:180-190.

HESS, R.S., SAUNDER, H.M., VAN WINKLE, T.J., WARD, C.R. **Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993–1998)** Journal American Veterinary Medical Association, 217 (2000), pp. 1166–1173

HOLLENBERG AN . **The role the thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuron as metabolic sensor.** Thyroid 2008 18 131–139.

IMAKI T, NAHAN JL, RIVIER C, SAWCHENKO PE, VALE W. 1991. **Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress.** J Neurosci 11(3): 585-599.

KELLY J.J., WILLIAMSON P., MARTIN A., WHITWORTH J.A. Effects of oral L-arginine on plasma nitrate and blood pressure in cortisol treated humans **J. Hypertens.**, 19 (2001), pp. 263–268

KAKUCSKA I, QI Y, LECHAN RM. **Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone.** Endocrinology. 1995 Jul;136(7):2795-802.

KELLER-WOOD ME, DALLMAN MF **Corticosteroid inhibition of ACTH secretion.** Endocr Rev. 1984 Winter;5(1):1-24.

KOOISTRA H.S.; GALAC S; BUIJTELS J.J.C.W.M; MEIJ, BP **Endocrine Diseases in Animals** Horm Res 2009;71(suppl 1):144–147

LABEUR M, THEODOROPOULOU M, SIEVERS C, PAEZ-PEREDA M, CASTILLO V, ARZT E, STALLA GK. New aspects in the diagnosis and treatment of Cushing disease. *Frontiers of hormone research* 2006;35:169-78.

LENNARTSSON AK, JONSDOTTIR IH. Prolactin in response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Psychoneuroendocrinology*. 2011 Nov;36(10):1530-9. Epub 2011 May 28

LEVY BH, TASKER JG. Synaptic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress. *Front Cell Neurosci*. 2012;6:24. Epub 2012 May 11.

LEVY B.H., TASKER J.G. Synaptic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress *Front Cell Neurosci*. 2012;6:24. Epub 2012 May 11.

LINDHOLM J, JUUL S, JORGENSEN JOL, ASTRUP J, BJERRE P, FELDT-RASMUSSEN U, HAGEN C, JORGENSEN J, KOSTELJANETZ M, KRISTENSEN LO, LAURBERG P, SCHMIDT K, WEEKE J Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: a population-based study *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86 (2001), pp. 117–123

LOU YK, WEN C, LI M, ADAMS DJ, WANG MX, YANG F, MORRIS BJ, WHITWORTH JA Decreased renal expression of nitric oxide synthase isoforms in adrenocorticotropin-induced and corticosterone-induced hypertension *Hypertension*, 37 (2001), pp. 1164–1170

MANGOS GJ, WHITWORTH JA, WILLIAMSON PM, KELLY JJ Glucocorticoids and the kidney *Nephrology*, 8 (2003), pp. 267–273

MANIAM J, MORRIS MJ. **The link between stress and feeding behaviour.** Neuropharmacology. 2012 Jul;63(1):97-110. Epub 2012 Apr 24.

MATHIOUDAKIS N, THAPA S, WAND GS, SALVATORI R. **ACTH-secreting pituitary microadenomas are associated with a higher prevalence of central hypothyroidism compared to other microadenoma types.** Clin Endocrinol (Oxf). 2012 May 1

MAYO-SMITH W, HAYES CW, BILLER BMK, KLIBANSKI A, ROSENTHAL H, ROSENTHAL DI **Body fat distribution measured with CT: correlations in healthy subjects, patients with anorexia nervosa and patients with Cushing's syndrome** Radiology, 170 (1989), pp. 515–518

MECAWI, A. S. **Controle neuroendócrino do apetite ao sódio após dieta hipossódica: Regulação integrada ao drive apetitivo e sua correlação com alterações comportamentais.** 2012 102f. Tese de doutorado em Fisiologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

MEIJ, BP Hypophysectomy as a treatment for canine and feline Cushing's disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2001 Sep;31(5):1015-41.

MELBY, J. C. (1989) **Clinical review, 1: Endocrine hyper-tension.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 69, 697

MELMED S. **Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary.** J Clin Invest. 2003; 112(11):1603–1618.

MORLEY JE. **Neuroendocrine control of thyrotropin secretion.** Endocrine Reviews 1981 12 396–436.

MORTON NM, SECKL JR. *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and obesity.* Front Horm Res 2008;36:146–64

NICOLOFF JT, FISHER DA, APPLEMAN MD, JR. (1970) **The role of glucocorticoids in the regulation of effect of glucocorticoids on thyrotropin secretion.** Journal of Clinical Investigation. 48(11):2096-2103

ORTEGA TM, FELDMAN EC, NELSON RW. **Systemic arterial blood pressure and urine protein-creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism.** J Am Vet Med Assoc 1996;209:1724–1729

ORTEGA, T., FELDMAN, E. C., NELSON, R. W. & FELDMAN, M. (1995) **Plasma aldosterone concentrations in dogs before and after o'p'-DDD therapy for pituitary-dependent hyperadrenocorticism** Journal of Veterinary Internal Medicine 9, 182

OTTOSSON M., VIKMAN-ADOLFSSON K., ENERBACK S., OLIVECRONA G., BJORNTORP P. **The effects of cortisol on the regulation of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 79 (1994), pp. 820–825

PASQUALI R, VICENNATI V, CACCIARI M, PAGOTTO U 2006 **The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome.** Ann NY Acad Sci 1083:111–128

PETERSON ME, PALKOVITS M, CHIUEH CC. **Biogenic amine and corticotrophin-releasing factor concentrations in hypothalamic paraventricular nucleus and biogenic amine levels in the median eminence of normal dogs, chronic dexamethasone-treated dogs, and dogs with naturally-occurring pituitary-dependent hyperadrenocorticism (canine Cushing's disease)** J Neuroendocrinol, 1 (1989) 169

PETERSON M.E., ALTSZULER N., NICHOLS, C.E. **Reased insulin sensitivity and glucose tolerance in spontaneous canine hyperadrenocorticism** Research in Veterinary Science, 36 (1984 Dec), pp. 177–182

PIVONELLO R, FAGGIANO A, LOMBARDI G, COLAO A (2005) **The metabolic syndrome and cardiovascular risk in Cushing's syndrome.** *Endocrinol Metab Clin N Am* 34:327–339

PREWITT CM, HERMAN JP. 1997. **Hypothalamo-pituitaryadrenocortical regulation following lesions of the central nucleus of the amygdala.** *Stress* 1(4): 263-280.

PRICE, S. R., B. K. ENGLAND, J. L. BAILEY, K. VAN VREEDE, AND W. E. MITCH. 1994. **Acidosis and glucocorticoids concomitantly increase ubiquitin and proteasome subunit mRNAs in rat muscle.** *Am. J. Physiol.* 36:C955-C960.

REBUFFE-SCRIVE M, KROTKIEWSKI M, ELFERSSON J, BJORNTORP P **Muscle and adipose tissue morphology in Cushing's syndrome** *J Clin Endocrinol Metab*, 67 (1988), pp. 1122–1125

RECHSTEINER, M. 1991. **Natural substrates of the ubiquitin proteolytic pathway.** *Cell.* 66:615-618.

RENÉ BAUDRAND B.¹, EUGENIO ARTEAGA U.¹, MANUEL MORENO G. **El tejido graso como modulador endocrino: Cambios hormonales asociados a la obesidade** *Rev. méd. Chile* vol.138 no.10 Santiago Oct. 2010

REIMONDO G., PIA A. , BOVIO S., ALLASINO B., DAFFARA F., PACCOTTI P., BORRETTA G., ANGELI A., TERZOLO M. **Laboratory differentiation of Cushing's syndrome** *Clin Chim Acta.* 2008 Feb;388(1-2):5-14. Epub 2007 Nov 9.

ROGERS WA, RUEBNER BH. **A retrospective study of probable glucocorticoid-induced hepatopathy in dogs.** *J Am Vet Med Assoc.* 1977 Mar 15;170(6):603-6.

SALA C, AMBROSI B, MORGANTI A **Blunted vascular and renal effects of exogenous atrial natriuretic peptide in patients with Cushing's disease** *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86 (2001), pp. 1957–1961

SAMUELS MH, MCDANIEL PA. (1997) **Thyrotropin levels during hydrocortisone infusions that mimic fasting-induced cortisol elevations: a clinical research center study.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 82(11):3700-3704.

SCHIMMER, B. P. & PARKER, K. L. (1996) **Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edn.** Eds J. G. Hardman, A. Goodman Gilman and L. E. Limbird. McGraw-Hill, New York. Pp 1454-1485

SLAVIN, B.G., ONG J.M., KERN, P.A. **Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes** Journal of Lipid Research, 35 (1994), pp. 1535–1541

SMETS P, MEYER E, MADDENS B, DAMINET S. **Cushing's syndrome, glucocorticoids and the kidney.** Gen Comp Endocrinol. 2010 Oct;169(1):1-10. Epub 2010 Jul 23.

SMITH L, SMITH, JB **Regulation of sodium-calcium exchanger by glucocorticoids and growth factors in vascular smooth muscle** J. Biol. Chem., 269 (1994), pp.

STEWART PM. **The adrenal cortex.** In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Foster DW, Wilson JD. Williams textbook of endocrinology. 10th ed. Philadelphia: Saunders, 2003. pp. 491-539.

SOLANO JM, JACOBSON L **Glucocorticoids Reverse leptin effects on food intake and body fat in mice without increasing NPYmRNA.** Am J Physiol. 1999 Oct;277(4Pt1):E708-16.

SPIEGELMAN BM, FLIER JS 2001 **Obesity and the regulation of energy balance.** Cell104:531–543 CrossRefMedline

SUZUKI, H.; HANDA, M.; KONDO, K.; SARUTA, T. **Role of renin-angiotensin system in glucocorticoid hypertension in rats.** Am J Physiol Endocrinol Metab 243: 48–51, 1982

TOJA, P.M., BRANZI, G., CIAMBELLOTTI F., RADAELLI P., DE MARTIN, M., LONATI L. M., PARAT M.S.G., CAVAGNINI F., GIRALDI, F.P. **Clinical relevance of cardiac structure and function abnormalities in patients with Cushing's syndrome before and after cure** Clinical Endocrinology (2012) 76, 332–338

TORRES SM, MCKEEVER PJ, JOHNSTON SD. **Effect of oral administration of prednisolone on thyroid function in dogs.** Am J Vet Res. 1991 Mar;52(3):416-21

TSIGOS, C & CHROUSOS, G. P. **Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress.** Journal of Psychosomatic Research, 53, 865–871, 2002.

TOMLINSON JW, WALKER EA, BUJALSKA IJ. **11betaHydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response.** Endocr Rev 2004;25:831-66

ULICK S, WANG JZ, BLUMENFELD JD, PICKERING TP **Cortisol inactivation overload – a mechanism of mineralocorticoid hypertension in the ectopic adrenocorticotropin syndrome** J. Clin. Endocrinol. Metab., 74 (1992), pp. 963–967

VAN RAALTE D. H., OUWENS D. M. AND DIAMANT M. **Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? You have full text access to this content** European Journal of Clinical Investigation Volume 39, Issue 2, Article first published online: 20 JAN 2009

VISSER TJ & LAMBERTS SW **Regulation of TSH secretion and thyroid function in Cushing's disease.** Acta Endocrinologica 1981 96 480–483

YAMAJI T, ISHIBASHI M, YAMADA A, TAKAKU F, ITABASHI A, KATAYAMA S, ISHII J, TAKAMI M, FUKUSHIMA T **Plasma levels of atrial natriuretic hormone in Cushing's syndrome** J. Clin. Endocrinol. Metab., 67 (1988), pp. 348–352

YASUDA, G., SHIONOIRI, H., UMEMURA, S., TAKASAKI, I. & ISHII, M. (1994) **Exaggerated blood pressure response to angiotensin II in patients with Cushing's syndrome due to adrenocortical adenoma.** European Journal of Endocrinology 131, 582-588

WAJCHENBERG, B.L. 2000. **Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome.** Endocr. Rev. 21: 697–738.

WALKER BR **Glucocorticoids and cardiovascular disease** Eur. J. Endocrinol., 157 (2007), pp. 545–559

WALKER BR, ANDREW R. **Tissue production of cortisol by 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease.** Ann N Y Acad Sci 2006;1083:165-84.

WALKER BR, YAU JL, BRETT LP, SECKL JR, MONDER C, WILLIAMS BC, EDWARDS CRW **11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vascular smooth muscle and heart - implications for cardiovascular responses to glucocorticoids** Endocrinology, 129 (1991), pp. 3305–3312

WEN C, LI M, WHITWORTH JA **Role of nitric oxide in adrenocorticotrophin-induced hypertension: L-arginine effects reversed by N-nitro-L-arginine** Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 27 (2000), pp. 887–890

WEN C, FRASER T, LI M, TURNER SW, WHITWORTH JA **Haemodynamic mechanisms of corticotropin (ACTH)-induced hypertension in the rat** J. Hypertens., 17 (1999), pp. 1715–1723

WEN C, FRASER T, LI M, WHITWORTH JA **Hemodynamic profile of corticotropin-induced hypertension in the rat** *J. Hypertens.*, 16 (1998), pp. 187–194

WHITNALL MH. 1993. **Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system.** *Prog Neurobiol* 40: 573-629.

WHITWORTH JA, COGHLAN JP, DENTON DA, FAN JSK, MCDOUGALL JG, SCOGGINS BA **Exaggerated natriuresis in ACTH hypertension in sheep** *Nephron*, 22 (1978), pp. 473–478

WILBER, J.F., UTIGER, R. D. **The Effect of Glucocorticoids on Thyrotropin Secretion** 1969 *J Clin Invest.* 1969 November; 48(11): 2096–2103.

WILLEBERG P, PRIESTER WA **Epidemiological aspects of clinical hyperadrenocorticism in dogs (canine Cushing's syndrome)** *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 18 (1982), pp. 717–724

WILSON, J. D., FOSTER, D. W. Introduction. In: WILSON J. D. & FOSTER, D. W. *William's textbook of endocrinology.* Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1985. P. 1-8.

WILBER JF, UTIGER RD. (1969) **The effect of glucocorticoids on thyrotropin secretion.** *Journal of Clinical Investigation.* 48(11):2096-2103.

WING, S. S., GOLDBERG A. L.. 1993. **Glucocorticoids activate the ATPubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting.** *Am. J.Physiol.* 264:E668-E676.