GABRIELE EBLING MATTOS

VIAS DE SINALIZAÇÃO E EFEITO BIOLÓGICO
DA CORTICOTROPINA (ACTH),
DO PEPTÍDEO NH₂-TERMINAL DA
PRÓ-OPIOMELANOCORTINA (N-POMC) E DO
FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS (FGF2)
EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS
DA SUPRARRENAL DE RATO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

GABRIELE EBLING MATTOS

VIAS DE SINALIZAÇÃO E EFEITO BIOLÓGICO
DA CORTICOTROPINA (ACTH),
DO PEPTÍDEO NH₂-TERMINAL DA
PRÓ-OPIOMELANOCORTINA (N-POMC) E DO
FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS (FGF2)
EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS
DA SUPRARRENAL DE RATO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Lotfi

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
reprodução não autorizada pelo autor

Mattos, Gabriele Ebling.

Vias de sinalização e efeito biológico da corticotropina (ACTH), do peptídeo NH₂-terminal da pró-opiomelanocortina (N-POMC) e do fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) em culturas primárias de células da suprarrenal de rato / Gabriele Ebling Mattos. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Prof^a. Dra Claudimara Ferini Pacicco Lofti.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Estudos *in vivo* e *in vitro* da sinalização, expressão gênica e proliferação de células normais e tumorais de suprarrenal.

Versão do título para o inglês: Signaling pathways and biological effects of corticotropin (ACTH), pro-opiomelanocortin NH₂-terminal peptide (N-POMC) and fibroblast growth factor type 2 (FGF2) in rat adrenal primary culture cells.

Descritores: 1. Cultura de células animais 2. Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) 3. Fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) 4. Pró-opiomelanocortina (POMC) 5. Proliferação celular 6. Apoptose I. Lofti, Prof^a Dra. Claudimara Ferini Pacicco II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.
ICB/SBIB048/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriele Ebling Mattos.

Título da Tese: Vias de sinalização e efeito biológico da corticotropina (ACTH), do peptídeo NH₂-terminal da pró-opiomelanocortina (N-POMC) e do fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) em culturas primárias de células da suprarrenal de rato.

Orientador(a): Claudimara Ferini Pacicco Lofti.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **83** nas fls. **90** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo do ciclo celular de células da suprarrenal de rato em cultura de células primárias** do qual participam o(s) alunos **Gabriele Ebling Mattos, Luana Cionoco Mendieta**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **10.08.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 10 de agosto de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Estrutura e Função Celular do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Bolsa de Doutorado Direto 06/00607-9.

*Aos meus pais, Édna Ebling Mattos
Rubem Mattos
e à minha irmã, Daniele Ebling Mattos.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã, pelo incentivo e amor incondicional.

À minha orientadora Dra. Claudimara Lotfi, pela paciência e dedicação.

À Dra. Maria Luiza Barreto de Chavez e à equipe do Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional – Departamento de Anatomia – ICB – USP.

À Dra. Elen Haruka Miyabara e à equipe do Laboratório de Plasticidade Músculo-Esquelética – Departamento de Anatomia – ICB – USP, pelo uso do espectrofotômetro de placa.

À Dra. Patrícia Castelucci e à Dra. Sílvia Lacchini do Laboratório Multidisciplinar de Disfunções Metabólicas – Departamento de Anatomia – ICB – USP, pelo uso da câmara fria.

À Dra. Estela Bevilacqua e à Dra. Mara Sandra Hoshida do Laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto – Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento – ICB – USP, pelo treinamento e permissão de uso do espectrofotômetro de placa.

À Dra. Eugênia Costanzi e à Dra. Juliana Colozzo Gregório do Laboratório de Terapia Gênica – Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento – ICB – USP, pela assistência nos ensaios de senescência.

Ao Dr. Gustavo Amarante Mendes e à Dra. Jacqueline Jacysyn do Laboratório de Controle Molecular da Apoptose – Departamento de Imunologia – ICB – USP, pela permissão e assistência no uso do citômetro de fluxo.

Ao Dr. Rui Curi e à Dra. Tatiana Loureiro do Laboratório de Controle do Metabolismo e Função de Leucócitos – Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB – USP, pela permissão e assistência no uso do citômetro de fluxo.

Ao Dr. Ângelo Geraldo Gambarini do Departamento de Bioquímica – Instituto de Química – USP, pela síntese do peptídeo FGF2 bovino recombinante.

À Dra. Maria Aparecida Juliano do Departamento de Bioquímica e Biofísica – UNIFESP, pelas sínteses do peptídeo N-POMC^{w/o}.

Aos componentes da minha banca de qualificação: Dra. Patrícia Gama, Dra. Silvy Stucchi Maria Engler e Dr. Antônio Marcondes Lerário, pelos valiosos comentários.

Aos meus inúmeros colegas de laboratório que me acompanharam nesta trajetória.

Aos meus queridos amigos do departamento, pelo apoio moral e emocional.

Ao Departamento de Anatomia e Instituto de Ciências Biomédicas, pela utilização de suas dependências.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia, pelo cuidado impecável com os animais utilizados nestes experimentos.

Aos funcionários da limpeza e segurança do ICB.

À CAPES e ao CNPq.

À FAPESP, pelo investimento de 7 anos.

Aos animais de experimentação.

“The important thing is not to stop questioning.”

Albert Einstein

“Truth is what stands the test of experience.”

Albert Einstein

*“It is not the strongest of the species that survives, nor the most
intelligent, but the one most responsive to change.”*

Charles Darwin

RESUMO

Mattos GE. Vias de sinalização e efeito biológico da corticotropina (ACTH), do peptídeo NH₂-terminal da pró-opiomelanocortina (N-POMC) e do fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) em culturas primárias de células da suprarrenal de rato. [Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A proliferação celular é um processo complexo, primariamente regulado por fatores de crescimento extracelulares. Um dos principais fatores que regulam o córtex adrenal é o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), no entanto existem evidências que outros fatores peptídicos como o fator de crescimento de fibroblastos do tipo 2 (FGF2) e os peptídeos N-terminais da pró-opiomelanocortina (N-POMC) podem estar envolvidos. As vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), ERK, JNK e p38, integram sinais de uma grande variedade de estímulos juntamente com outras vias de sinalização como PKA, PKC e PI3K/Akt, e promovem respostas como proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular. Embora haja grandes avanços sobre a ação do ACTH e FGF2 em linhagens de células adrenais tumorais de camundongo e humana, essa ação ainda é pouco conhecida em células adrenocorticais normais, principalmente em relação à ação dos peptídeos N-POMC. Neste trabalho nós analisamos a importância das vias de sinalização e sua influência nas respostas biológicas como viabilidade, proliferação e morte celular, induzidas pelo ACTH, FGF2 e os peptídeos N-POMC, com N-POMC^w e sem pontes dissulfeto N-POMC^{w/o}, através de inibidores farmacológicos e moleculares específicos, utilizando um modelo biológico bem caracterizado de culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticuladas (F/R). Nossos resultados mostram que os peptídeos N-POMC e o FGF2 promovem a proliferação celular enquanto o ACTH estimula progressiva perda de atividade metabólica e viabilidade, diminuição da proliferação e morte celular por apoptose. Através da análise dos inibidores farmacológicos e moleculares observou-se que as vias mediadoras envolvidas na resposta proliferativa do FGF2 e da N-POMC são, respectivamente, as vias ERK/JNK e ERK/JNK/Akt. Por outro lado, a resposta pró-apoptótica promovida pelo ACTH é mediada pela via p38, provavelmente associada à ausência de ativação das vias relacionadas com a sobrevivência, como as vias ERK e JNK.

Palavras-chave: Cultura primária de suprarrenal de rato. Corticotropina (ACTH). Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF2). Peptídeo NH₂-terminal da Pró-opiomelanocortina (N-POMC). Proteínas Kinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs). Proliferação. Morte Celular.

ABSTRACT

Mattos GE. Signaling pathways and biological effects of corticotropin (ACTH), pro-opiomelanocortin NH₂-terminal peptide (N-POMC) and fibroblast growth factor type 2 (FGF2) in rat adrenal primary culture cells. [Ph. D. thesis (Morphofunctional)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Cell proliferation is a complex process, primarily regulated by external growth factors. One of the main factors that regulate adrenal cortex is the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), however there are evidences that other peptide factors such as the fibroblast growth factor type 2 (FGF2) and pro-opiomelanocortin N-terminal fragments (N-POMC) might also be involved. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, ERK, JNK and p38, together with other signaling pathways such as PKA, PKC and PI3K/Akt integrate signals from a diverse range of stimuli and trigger responses as proliferation, differentiation, survival and cell death. Although there are great advances regarding ACTH and FGF2 action in human and mice tumor cell lines, this action is still little known in normal adrenocortical cells, especially regarding N-POMC peptides effects. In the present study we analyze the importance of these pathways and their influence in biological responses such as viability, cell proliferation and cell death stimulated by ACTH, FGF2 and N-POMC peptides, with N-POMC^w and without N-POMC^{w/o} disulfide bridges, using specific pharmacological and molecular inhibitors in a well-characterized isolated primary culture of Glomerulosa (G) and Fasciculata/Reticularis cells (F/R). Our results show that FGF2 and N-POMC peptides trigger cell proliferation while ACTH stimulates progressive loss of metabolic activity and viability, decrease proliferation and cell death by apoptosis. Through the analysis of pharmacological and molecular inhibitors it was shown that the mediating signaling pathways involved in FGF2 and N-POMC proliferative effects are, respectively, ERK/JNK and ERK/JNK/Akt. On the other hand, the pro-apoptotic response promoted by ACTH is through p38 signaling, probably associated with the absence of activation of other pathways involved with cell survival, like ERK and JNK.

Key words: Rat adrenal primary culture cells. Corticotropin (ACTH). Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2). NH₂-terminal Pro-opiomelanocortin Peptide (N-POMC). Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs). Proliferation. Cell Death.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Secção longitudinal de suprarrenal humana	23
Figura 2: Secção longitudinal de suprarrenal de rato	25
Figura 3: Corte histológico de suprarrenal de rato corado com H&E	26
Figura 4: Esquema do eixo HPA	29
Figura 5: Esquema do processamento da proteína POMC	30
Figura 6: Esquema simplificado das vias de sinalização analisadas	37
Figura 7: Fotos do protocolo de obtenção das suprarrenais e dissecação	43
Figura 8: Protocolo de análise de proliferação utilizando azul de tripan	47
Figura 9: Protocolo de análise de proliferação utilizando reagente MTS	48
Figura 10: Protocolo de análise da senescência com coloração SA- β -gal	50
Figura 11: Protocolo de análise da apoptose utilizando Anexina V e IP	53
Figura 12: Esquema do gráfico resultante da análise por citometria de fluxo	54
Figura 13: Protocolo de tratamento, lisado, eletroforese e <i>immunoblotting</i>	56
Figura 14: Protocolo para análise da eficiência de transfecção com siRNA	60
Figura 15: Protocolo para análise da cinética de silenciamento com siRNA	62
Figura 16: Protocolo dos experimentos de efeito biológico com siRNA	63
Figura 17: Fotomicrografias das culturas coradas com H&E e ORO	66
Figura 18: Expressão das proteínas P450 11 β -hidroxilase e tirosina hidroxilase através de <i>immunoblotting</i> e imunoperoxidase	68
Figura 19: Fotomicrografias de contraste de fase dos efeitos dose e tempo-dependente ao ACTH	70
Figura 20: Ensaios de viabilidade e proliferação com corante vital azul de tripan e ensaio de MTS, efeitos dose e tempo-dependente ao ACTH	73
Figura 21: Ensaios de viabilidade e proliferação por MTS, efeitos dose e tempo-dependente ao FGF2	74

Figura 22: Ensaios de viabilidade e proliferação por MTS, efeitos dose e tempo-dependente ao N-POMC com e sem pontes dissulfeto	75
Figura 23: Ensaio de senescência através de coloração por SA- β -Gal, ação dose e tempo-dependente ao ACTH	77
Figura 24: Experimento representativo dos efeitos dose e tempo-dependente ao ACTH no ciclo celular	78
Figura 25: <i>Immunoblotting</i> representativo da expressão de LC3B-II	79
Figura 26: Ensaio de citometria de fluxo para análise do efeito apoptótico do ACTH	81
Figura 27: <i>Immunoblotting</i> representativo e densitometria da fosforilação de ERK, JNK e p38 após tratamentos com ACTH e FGF2	83
Figura 28: <i>Immunoblotting</i> representativo e densitometria da fosforilação de ERK após tratamentos com N-POMC	84
Figura 29: <i>Immunoblotting</i> representativo e densitometria da fosforilação de p38 e JNK após tratamentos com N-POMC	85
Figura 30: <i>Immunoblotting</i> representativo e densitometria da fosforilação de CREB e Akt após tratamentos com ACTH, FGF2 e N-POMC	86
Figura 31: Ensaios de <i>immunoblotting</i> para a determinação das concentrações dos inibidores das vias de sinalização	88
Figura 32: Ensaio de MTS com inibidores das vias de sinalização	90
Figura 33: Ensaio de citotoxicidade por MTS utilizando inibidores específicos das vias de sinalização ERK, PKA e PKC	92
Figura 34: Ensaio de citotoxicidade por MTS utilizando inibidores específicos das vias de sinalização JNK, p38 e PI3K/Akt	93
Figura 35: <i>Immunoblotting</i> representativo das proteínas CREB e ERK e sua fosforilação em células transfectadas com siRNA	97
Figura 36: Ensaios de viabilidade e proliferação por MTS, efeito do ACTH e FGF2 nas células silenciadas para CREB ou ERK	98
Figura 37: Ensaios de viabilidade e proliferação por MTS, efeito dos peptídeos N-POMC na viabilidade das células da cultura após sete dias	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos siRNAs para CREB e ERK	61
Tabela 2 - Efeito pró-apoptótico do ACTH	80
Tabela 3 - Vias de sinalização ativadas pelo ACTH, FGF2, A+F e N-POMC com e sem pontes dissulfeto nas células G	116
Tabela 4 - Vias de sinalização ativadas pelo ACTH, FGF2, A+F e N-POMC com e sem pontes dissulfeto nas células F/R	116
Tabela 5 - Efeitos biológicos induzidos pelo ACTH, FGF2, A+F e A+P, peptídeos N-POMC com e sem pontes dissulfeto e ação dos inibidores das vias de sinalização nas células G	117
Tabela 6 - Efeitos biológicos induzidos pelo ACTH, FGF2, A+F e A+P, peptídeos N-POMC com e sem pontes dissulfeto e ação dos inibidores das vias de sinalização nas células F/R	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
Akt ou PKB	Akt ou Proteína Quinase B
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Proteína Ativadora 1 - Fator de Transcrição
ASK	Quinase Reguladora de Sinal de Apoptose
ATF-1 e ATF-2	Fator de Transcrição Dependente de cAMP 1 e 2
ATP	Adenosina Trifosfato
Bad	Promotor de Morte Associado a Bcl-2
β -END	β -Endorfina
β -Gal	β -Galactosidase
BSA	Albumina Sérica Bovina
CaM kinase II	Proteína Quinase Dependente de Cálcio/Calmodulina
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina
Cdc42s	Proteína Controladora da Divisão Celular-Pequenas GTPases
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
c-Jun	Fator de Transcrição - Gene de resposta primária
CLIP	Peptídeo do Lobo Intermediário Semelhante a Corticotropina
COX-2	Ciclooxigenase 2
c-Raf	MAPKKK
CREB	Elemento de Ligação Responsivo a cAMP
CREM	Elemento Modulador Responsivo a cAMP
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
CYP11B1	Gene da Enzima Citocromo P450 11- β hidroxilase
CYP11B2	Gene da Enzima Citocromo P450 aldosterona sintase
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacylglicerol
DHEA	Deidroepiandrosterona
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNase I	Desoxiribonuclease 1
DOC	Desoxicorticosterona
DOPA	Diidroxifenilalanina

EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético - Agente Quelante
Elk-1	Membro da Família de Fatores de Transcrição E-vinte e seis
ERK	Proteína Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares
Ets 1	Fator de Transcrição E-vinte e seis
FACS	Citometria de Fluxo
FGF-a ou FGF1	Fator de Crescimento de Fibroblasto Ácido ou 1
FGF-b ou FGF2	Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico ou 2
FGFR	Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblasto
FL1-H	Canal/Filtro no FACS para Fluoróforo Verde-Azulado
FL2-H	Canal/Filtro no FACS para Fluoróforo Vermelho
FL3-H	Canal/Filtro no FACS para Fluoróforo Vermelho
F/R	Células Fasciculadas/Reticuladas
G	Células Glomerulosas
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Deidrogenase
GTP	Guanosina Trifosfato
H-89	Inibidor de PKA
H&E	Hematoxilina e Eosina
HEPES	Agente Tamponante
HPA	Eixo Fisiológico Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal
HRP	Peroxidase de raiz-forte
IC ₅₀	Metade da Concentração Inibitória Máxima
IFN-γ	Interferon-γ
IL-2	Interleucina 2
IP	Iodeto de Propídeo
JNK	Quinase de c-Jun N-terminal
LC3B	Proteína Cadeia Leve 3 B
LPH	Lipotropina
LY294002	Inibidor de PI3K
MAP	Proteína Associada a Microtúbulo
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitogênico
MAPKK, MEK, MKK	MAPK Quinase
MAPKKK, MEKK, MAP3K	MAPKK Quinase
Max/Myc/Mad	Família de Fatores de Transcrição com Zipper de Leucina
MC2R	Receptor de Melanocortina 2
MLK	Quinases de Linhagem Mista
MSH	Hormônio Estimulador de Melanócito
MTS	Ensaio Colorimétrico de Citotoxicidade/Proliferação

Myc	Fator de Transcrição Codificado pelo Gene Mielocitomatose
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NCI-H295	Linhagem de Células de Carcinoma Adrenocortical Humano
NGF	Fator de Crescimento Neural
NIH 3T3	Linhagem de Células de Fibroblastos de Camundongo
NP40	Nonidet P 40
N-POMC	Peptídeo N-terminal da Pró-opiomelanocortina
N-POMC ^w	N-POMC com pontes dissulfeto (with)
N-POMC ^{w/o}	N-POMC sem pontes dissulfeto (without)
ORO	Coloração de <i>Oil Red O</i>
p38	Quinase p38
P450scc	Citocromo P450 Clivagem da Cadeia Lateral
p53	Fator de Transcrição p53
p90 ^{rsk}	Proteína Quinase da Família da Quinase Ribossomal s6
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PBSA	Solução Salina Tamponada sem Cálcio e Magnésio
PC12	Linhagem de Células Adrenomedulares de Rato
PD98059	Inibidor de MEK/ERK
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PI3K	Fosfoinositol 3 Quinase
PI4K	Fosfoinositol 4 Quinase
PIP2	Fosfatidil Inositol Bi-Fosfato
PKA	Proteína Quinase Dependente de cAMP, Proteína Quinase A
PKB ou Akt	Proteína Quinase B ou Akt
PKC	Proteína Quinase Dependente de Cálcio e Fosfolipídeos
PMSF	Fluoreto Fenil Metil Sulfonil - Inibidor de Protease
POMC	Pró-opiomelanocortina
Proteína G	Proteína Heterotrimérica Ligada a GTP
Rac	Família de Pequenas GTPases
Ras	Família de Pequenas GTPases
Rho	Família de Pequenas GTPases
RIPA	Tampão para Ensaio de Radio Imuno Precipitação
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAi	RNA de Interferência
RNA ^m	RNA Mensageiro
SA-β-Gal	β-Galactosidase Associada a Senescência

SB203580	Inibidor de p38 Quinase
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Sódio Dodecil Sulfato - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	Pequeno RNA de interferência
Smad3	Fator de Transcrição
Sos	GTPases Filho de <i>Sevenless</i>
SP600125	Inibidor de JNK
Stat1	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
TBST	Solução Tampão de Tris + Tween 20
TH	Tirosina Hidroxilase
TNF	Fator de Necrose Tumoral
U0126	Inibidor de MEK/ERK
UV	Radiação Ultravioleta
Y1	Células de Carcinoma Adrenocortical de Camundongo

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato ou Ácido aspártico
Cys, Cis	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato ou Ácido glutâmico
Gly, Gli	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys, Lis	Lisina
Met	Metionina
Phe ou Fen	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr, The	Treonina
Tyr, Tir	Tirosina
Trp, Tri	Triptofano
Val	Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 História e Etimologia	22
1.2 A Glândula Suprarrenal Humana	22
1.3 A Suprarrenal de Ratos	24
1.4 Embriologia e Histologia	25
1.5 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, Eixo HPA	28
1.6 O Peptídeo NH ₂ -terminal da Pró-opiomelanocortina, N-POMC	29
1.7 O Hormônio Adrenocorticotrópico, ACTH	31
1.8 O Fator de Crescimento de Fibroblastos Tipo 2, FGF2	32
1.9 As Vias de Sinalização	34
1.10 As Vias de Sinalização Ativadas pelo ACTH	36
2 OBJETIVOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Peptídeos	41
3.2 Cultura Primária de Suprarrenal de Rato	42
3.3 Imunocitoquímica e Colorações de Hematoxilina e Eosina e ORO	44
3.4 Efeitos Biológicos	46
3.4.1 Análise da Proliferação Celular Através de Ensaio de Viabilidade	46
3.4.2 Análise da Proliferação Celular Através de Ensaio Colorimétrico	47
3.4.3 Análise da Senescência Através do Método da β -galactosidase	49
3.4.4 Análise da Autofagia Através da Expressão da Proteína LC3B	50
3.4.5 Análise da Apoptose Através da Ligação de Anexina V	52
3.5 <i>Immunoblotting</i>	54
3.5.1 Preparação do Lisado Celular	54
3.5.2 Reação com o Anticorpo de Interesse	55
3.6 Inibição das Vias de Sinalização	57
3.6.1 Inibidores Farmacológicos	57
3.6.2 RNA de Interferência (RNAi)	58
3.6.2.1 <i>Eficiência de Transfecção</i>	60
3.6.2.2 <i>Silenciamento</i>	60

3.6.2.3 Modulação do Efeito Biológico	62
3.7 Análise Estatística	63
4 RESULTADOS	64
4.1 Caracterização da Cultura Primária de Suprarrenal de Rato	65
4.2 O Efeito Biológico Promovido pelo ACTH, FGF2 e N-POMC	69
4.2.1 Análise da Proliferação e Viabilidade das Células G e F/R	69
4.2.2 Análise da Senescência nas Células G e F/R tratadas com ACTH	76
4.2.3 Análise da Autofagia nas Células G e F/R tratadas com ACTH	79
4.2.4 Análise da Morte Celular nas Células G e F/R tratadas com ACTH	80
4.3 Análise das Vias de Sinalização ativadas pelo ACTH, FGF2 e N-POMC nas Culturas Primárias da Suprarrenal de Rato	82
4.3.1 As vias MAPKs: ERK1/2, JNK e p38	82
4.3.2 As vias PKA e PKB (Akt)	85
4.4 Inibição das Vias de Sinalização nas Culturas Primárias de Suprarrenal de Rato	87
4.4.1 A Utilização de Inibidores Farmacológicos	87
4.4.2 A Utilização da Interferência de RNA para Inibição de ERK e CREB	96
5 DISCUSSÃO	101
5.1 A Caracterização da Cultura Primária	102
5.2 O Efeito Biológico	103
5.3 A Análise das Vias de Sinalização e sua Inibição nas Células G e F/R	108
5.3.1 A via MAPK-ERK	108
5.3.2 A via MAPK-JNK	110
5.3.3 A via MAPK-p38	111
5.3.4 A via PKA e PKC	112
5.3.5 A via PKB (Akt)	112
6 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS	119
ANEXOS	132
ANEXO A – Mattos e Lotfi, 2005	132
ANEXO B – Almeida et al., 2008	145
ANEXO C – Artigo submetido na Molecular and Cellular Endocrinology	154

1 INTRODUÇÃO

1.1 História e Etimologia

As glândulas suprarrenais foram descritas anatomicamente por Bartholomeo Eustachius em 1563, mas somente em 1855 Thommas Addison demonstrou a função das *suprarenal capsules* na doença que hoje leva o seu nome. Assim, o adjetivo suprarrenal, inicialmente usado para indicar a situação topográfica das glândulas, foi substantivado, passando a nomear a própria glândula. A denominação *adrenal* só começa a aparecer em língua inglesa a partir de 1875.

A duplicidade de nomes existentes para a glândula decorre da sua disposição anatômica. O prefixo *supra-* expressa a ideia de que as glândulas se colocam acima dos rins, que no caso dos humanos é a mais apropriada dada a posição anatômica bípede; enquanto o prefixo *ad-*, significa próximo ao rim, sendo esta a denominação mais adequada no caso de animais quadrúpedes como o rato, por exemplo. Dada a influência que as publicações médicas norte-americanas têm exercido sobre a linguagem científica, nota-se, ultimamente, a tendência ao uso do termo adrenal também para humanos, mas trata-se claramente de um anglicismo (Stewart, 2008).

1.2 A Glândula Suprarrenal Humana

As glândulas suprarrenais com 2 a 3 cm de largura, 3 a 6 cm de comprimento, aproximadamente 1 cm de espessura e cerca de 4 g se situam em posição retroperitonal, de cada lado da coluna vertebral contra a face superomedial do rim correspondente. Entre as glândulas estão: os pilares do diafragma, aorta, tronco e plexo celíacos e a veia cava inferior. *In vivo* apresentam coloração castanha amarelada devido a presença de substâncias lipoides (Figura 1) (Moore, 1994). Cada uma das glândulas é revestida, juntamente com seu respectivo rim, pela fáscia renal, à qual estão firmemente aderidos (Dângelo e Fattini, 2007).

Figura 1: Secção longitudinal de suprarrenal humana indicando cápsula, córtex e medula.

A: Suprarrenal humana a fresco; **B:** Esquema de suprarrenal humana.

FONTE: **A:** Biology Reference ([2011]).

B: Adaptado de Netter, 2008. Prancha 347: Rins e Glândulas Suprarrenais.

A suprarrenal direita tende a ter um formato triangular-piramidal, localiza-se entre o diafragma posteromedialmente e a veia cava inferior anteromedialmente. A parte medial de sua face anterior fica atrás da veia cava inferior. Superiormente, a glândula situa-se sobre a área nua do fígado. Sua extremidade inferior é recoberta por peritônio refletido sobre ela a partir do fígado. Seu hilo encontra-se na face anterior (Moore, 1994). A suprarrenal direita encontra-se, frequentemente, localizada mais abaixo e mais lateralmente que a suprarrenal esquerda.

A suprarrenal esquerda tende a ser mais alongada em formato semilunar, situa-se no leito gástrico e se relaciona anteriormente com o estômago e o pâncreas e posteriormente com o diafragma. Sua parte inferior não fica recoberta por peritônio no ponto onde é cruzada anteriormente pela cauda do pâncreas e a artéria esplênica. Seu hilo também está na face anterior (Moore, 1994).

Devido a sua função endócrina, as glândulas suprarrenais são órgãos ricamente vascularizados. No homem, as suprarrenais são irrigadas por três pedículos arteriais: a artéria suprarrenal superior (origina-se da artéria frênica inferior), a artéria suprarrenal média (ramo direto da aorta abdominal) e a artéria suprarrenal inferior (originada da artéria renal) (Dângelo e Fattini, 2007).

A drenagem venosa do córtex e da medula é feita por uma única veia suprarrenal. Enquanto a veia suprarrenal direita desemboca diretamente na veia cava inferior, a veia suprarrenal esquerda se une à veia frênica inferior, posteriormente na veia renal esquerda e então na veia cava inferior. Já a drenagem venosa da cápsula é feita por veias próprias.

A rede de vasos linfáticos que drenam as suprarrenais origina-se de um plexo situado profundamente na cápsula e outro situado na medula. A maioria destes vasos linfáticos drena para os linfonodos lombares superiores (aórticos laterais) (Moore, 1994).

1.3 A Suprarrenal de Ratos

No rato, as suprarrenais apresentam coloração castanha, consistência firme e estão localizadas lateralmente à coluna vertebral na cavidade abdominal, circundadas pela gordura retroperitoneal, próximas ao polo cranial de cada rim e aderidas ao aspecto ventral dos músculos sublombares.

A suprarrenal direita em formato de feijão está localizada a 8 - 10 mm da linha mediana e está coberta pelo lobo caudado do fígado, suas dimensões são as seguintes: 4 - 5,5 mm de comprimento, 3 - 4,5 mm de largura e 2,8 - 3 mm de espessura, seu peso médio é de 21,8 mg em machos e 25,7 mg em fêmeas. A suprarrenal esquerda em formato ovoide está posicionada ligeiramente medial ao polo cranial do rim esquerdo a uma distância de 4 - 5 mm da linha mediana e suas proporções são as seguintes: 4,5 - 5,5 mm de comprimento, 3,2 - 4,5 mm de largura e 2,5 - 2,8 mm de espessura, peso médio de 20,5 mg nos machos e 31,6 mg nas fêmeas. As suprarrenais de rato apresentam dimorfismo sexual, sendo relativamente maiores nas fêmeas do que nos machos: em relação ao peso corpóreo (ratos com 200 g) o peso das duas suprarrenais é em média de 0,017% nos machos e 0,026% nas fêmeas (Hebel e Stromberg, 1986).

No rato, as suprarrenais são irrigadas por dois pedículos arteriais: a artéria suprarrenal superior (ramo direto da aorta abdominal) e a artéria suprarrenal inferior (originada da artéria renal). Os ramos dessas artérias formam um plexo subcapsular do qual surgem três grupos de vasos arteriais: artérias da cápsula, artérias do córtex e artérias da medula.

A medula da suprarrenal é innervada por delicadas fibras simpáticas colinérgicas pré-ganglionares, através dos nervos esplânicos abdominopélvicos e ramo do plexo celíaco. Aparentemente, o córtex suprarrenal recebe somente um suprimento nervoso vasomotor (Popesko et al., 2002).

Em uma secção longitudinal a fresco é possível observar duas regiões: uma porção cortical amarelada periférica revestida por uma cápsula conjuntiva transparente e outra medular interna de coloração castanho-avermelhada (Figura 2). Essas regiões são distintas ontogenética, filogenética, estrutural e funcionalmente, representando dois órgãos distintos, unidos topograficamente (Junqueira e Carneiro, 2004).

Figura 2: Secção longitudinal de suprarenal de rato indicando cápsula, córtex e medula.
FONTE: **B:** Adaptado de Bowen, 2002.

1.4 Embriologia e Histologia

A medula da suprarenal tem sua origem embriológica a partir da neuroectoderme, mais especificamente das células da crista neural sendo, portanto, considerada uma porção modificada da divisão simpática do sistema nervoso autônomo (neurônios simpáticos pós-ganglionares). Estas células estão arranjadas em grupos de cordões rodeando capilares sanguíneos e vênulas e, pelo fato de serem coradas com sais de cromo, são chamadas células cromafins. As células cromafins têm formato poliédrico e produzem dois hormônios: adrenalina (epinefrina) e noradrenalina (norepinefrina) através da ação catalisadora da enzima tirosina hidroxilase. Esses dois hormônios são moléculas estruturalmente similares e funcionam cooperativamente para preparar o corpo para emergências ou estresses durante a reação de luta ou fuga. A disposição das células cromafins se dá de tal maneira que estão sempre localizadas entre um capilar e uma veia, polarizadas na direção da veia. As fibras nervosas chegam pelo lado do capilar, enquanto que os grânulos citoplasmáticos de secreção se acumulam no polo celular voltado para a veia, onde são lançados (Junqueira e Carneiro, 2004).

O córtex da suprarrenal contribui com aproximadamente 80 - 90% do peso total da glândula no rato adulto e é responsável pela produção de hormônios que, em conjunto, são denominados esteroides. Suas células são derivadas do epitélio celomático, mais especificamente da mesoderme da parede abdominal posterior, mesma região que dá origem às gônadas. O córtex está externamente limitado por uma cápsula de tecido conjuntivo que projeta trabéculas para o seu interior e acompanham vasos e nervos até a medula. As células corticais são epitelioides de formato poliédrico com núcleos arredondados e inclusões lipídicas no citoplasma e estão organizadas em três camadas ou zonas concêntricas histologicamente bem definidas: zona Glomerulosa, zona Fasciculada e zona Reticulada (Figura 3). A ultraestrutura das três zonas compartilha similaridades com outras células sintetizadoras de esteroides como: numerosos lipossomos, extenso retículo endoplasmático liso, complexo de Golgi bem desenvolvido e muitas mitocôndrias internamente especializadas (Junqueira e Carneiro, 2004).

Figura 3: Corte histológico de suprarrenal de rato corado com hematoxilina e eosina. Aumento de 100×.
FONTE: Adaptado de Torres e Lotfi, 2007, com permissão.

A zona Glomerulosa é uma região relativamente delgada (15% do volume total da glândula) localizada na parte mais externa do córtex imediatamente abaixo da cápsula conjuntiva e suas células estão organizadas em aglomerados arredondados e arciformes entremeados por capilares. As células desta zona são

pequenas em geral (12 – 15 μm), piramidais ou colunares, de núcleo esférico excêntrico único e citoplasma acidófilo contendo grumos basófilos e gotículas de lipídeos. Esta zona sintetiza e secreta hormônios associados com a homeostase de eletrólitos no líquido extracelular, os mineralocorticoides, como por exemplo, a aldosterona, que promove a reabsorção de sódio e a excreção de potássio nos túbulos contorcidos distais e ducto coletor do néfron (urina), bem como, na mucosa gástrica (suco gástrico), glândulas sudoríparas (suor) e salivares (saliva). A liberação destes hormônios é controlada pelo sistema renina-angiotensina e pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH).

A zona Fasciculada, que corresponde à parte intermediária do córtex e é a maior na maioria dos mamíferos, ocupando 75% do volume total da glândula, está arranjada em colunas paralelas que correm radialmente em relação a superfície da glândula intercaladas com capilares. Estas células são, na maioria das espécies, maiores que das outras zonas (aproximadamente 20 μm), poliédricas, de citoplasma levemente basófilo contêm grânulos finos e um grande número de gotículas lipídicas (colesterol, ésteres de colesterol e lipídeos insaturados). Esta zona secreta hormônios relacionados ao metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, os glicocorticoides, especificamente a corticosterona em roedores, que têm como efeito primário o aumento da gliconeogênese e da síntese e armazenamento de glicogênio, além disso, inibem a utilização de glicose pelos tecidos periféricos mobilizando ácidos graxos do tecido adiposo, em um esforço conjunto de aumentar e manter o nível plasmático de glicose. A liberação dos glicocorticoides é regulada pelo ACTH.

A zona mais profunda do córtex e adjacente à medula, a zona Reticulada, apresenta suas células arranjadas de forma tridimensional em uma rede de cordões entrelaçados. Estas células são menores que as das demais zonas, têm núcleo picnótico e citoplasma eosinófilo com pequena quantidade de inclusões lipídicas, podendo apresentar grânulos de pigmento pardo (lipofucsina) que conferem, a fresco, a esta zona um aspecto mais escuro que o restante do córtex. Esta zona secreta hormônios andrógenos, semelhantes aos hormônios sexuais masculinos, como a dehidroepiandrosterona (DHEA) e DHEA sulfatada, e estrogênios, semelhantes aos hormônios sexuais femininos (Junqueira e Carneiro, 2004).

1.5 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, Eixo HPA

A função básica da suprarrenal é manter a homeostase do organismo, pois uma grande variedade de estímulos, fisiológicos, como estresse e exercícios físicos, ou patológicos, como as infecções, provocam alteração do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal: eixo HPA. Os mecanismos pelos quais a função da suprarrenal é controlada foram elucidadas no século XX por Philip E. Smith que documentou a existência de um eixo funcional entre a hipófise e a suprarrenal, e D. J. Ingle e Edward C. Kendall que descreveram a ação inibitória de extratos adrenocorticais na síntese de ACTH pela hipófise (Ingle e Kendall, 1937).

A produção e liberação dos corticosteroides produzidos pelo córtex das suprarrenais são controladas pelo eixo HPA. Estímulos provenientes de várias regiões do sistema nervoso estimulam as células nos núcleos hipotalâmicos, paraventricular e supraóptico, a produzir a vasopressina e o hormônio liberador de corticotropina (CRH).

O CRH é sintetizado no hipotálamo na forma de um precursor de 191 aminoácidos denominado pré-pró-CRH, que posteriormente é processado a um peptídeo de 41 aminoácidos. A atividade biológica do CRH está contida na região NH₂-terminal e sua estrutura é preservada entre as diferentes espécies. O CRH chega à adeno-hipófise por meio do sistema porta-hipofisário e se liga a receptores específicos nas células corticotróficas. O receptor de CRH é uma proteína de membrana acoplada à proteína G (proteína heterotrimérica ligada a guanosina trifosfato-GTP) que, quando ativado, aumenta os níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), fosforilando a proteína quinase dependente de cAMP (PKA), cujo resultado final é o aumento de transcrição da pró-opiomelanocortina (POMC), o precursor imediato do ACTH.

A duração do ciclo claro-escuro, ritmo de alimentação, horas de sono e nível de estresse determinam o ritmo circadiano que controla a liberação de diversos hormônios, inclusive do CRH. O eixo HPA pode ser inibido na presença de altas concentrações de corticosteroides naturais ou sintéticos, como a dexametasona, na corrente sanguínea, de maneira que, por efeito da retroalimentação negativa, os corticosteroides inibem a secreção e posteriormente a síntese do CRH, da POMC e do ACTH no hipotálamo e na adeno-hipófise, respectivamente (Figura 4) (Aguilera, 1994; Nemeroff, 1996).

Figura 4: Esquema do eixo HPA mostrando o efeito de retroalimentação negativa (-) por corticosteroides. CRH: Hormônio Liberador de Corticotropina; POMC: Pró-opiomelanocortina; ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico.

1.6 O Peptídeo NH₂-terminal da Pró-opiomelanocortina, N-POMC

O pró-hormônio pró-opiomelanocortina (POMC) é uma glicoproteína de 241 aminoácidos e 32 KDa precursor da corticotropina (ACTH), da lipotropina (LPH), do hormônio estimulador de melanócito (MSH) e da β -endorfina (β -END). É sintetizado e secretado pela hipófise e em outras regiões do cérebro, fígado, rim, trato gastrointestinal, placenta, linfócitos e monócitos (Vrezas et al., 2003), mas como nesses tecidos periféricos o RNA mensageiro (RNAm) da POMC não apresenta os exons 1 e 2 nem o peptídeo-sinal, é provável que haja algum problema na tradução e/ou na sua secreção (Stewart, 2008).

No lobo anterior da hipófise, os principais produtos peptídicos originados da POMC são: o peptídeo NH₂-terminal (N-POMC), o peptídeo de ligação (*Joining Peptide*), o ACTH e a β -LPH. No lobo intermediário, o ACTH é clivado formando o precursor do α -MSH e o peptídeo do lobo intermediário semelhante a corticotropina (CLIP); a β -LPH é completamente processada em γ -LPH e β -END e o peptídeo N-POMC₁₋₇₆ é clivado para gerar γ -MSH e N-POMC₁₋₄₉ (Figura 5).

- Lobo anterior da hipófise:

- Lobo intermediário da hipófise:

Figura 5: Esquema do processamento da proteína da Pró-opiomelanocortina (POMC) e seus subprodutos nas diferentes etapas. γ -MSH: hormônio estimulador de melanócitos gama; α -MSH: hormônio estimulador de melanócitos alfa; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; β -LPH: lipotropina beta; γ -LPH: lipotropina gama; CLIP: Peptídeo do Lobo Intermediário Semelhante à Corticotropina; β -END: endorfina beta; N-POMC: Porção NH₂-terminal da POMC.
FONTE: Adaptado de Estivariz et al., 1982.

Os fragmentos NH₂-terminais da POMC, denominados de N-POMC, têm sido descritos como estimuladores da proliferação de células adrenocorticais (Estivariz et al., 1982; Lowry et al., 1983). Os peptídeos N-POMC₁₋₂₈ e N-POMC₂₋₅₄ se mostraram potentes agentes mitogênicos tanto *in vitro* (Estivariz et al., 1982) quanto *in vivo* (Estivariz et al., 1988). Há evidências de que os fragmentos N-POMC apesar de apresentarem uma ação esteroideogênica fraca, possam modular a ação esteroideogênica do ACTH (Estivariz et al., 1982; Lowry et al., 1983, 1984; Fassnacht et al., 2003). Resultados publicados do laboratório, em ratos tratados com

dexametasona, mostraram que a administração do peptídeo sintético modificado N-POMC₁₋₂₈ sem as pontes dissulfeto (N-POMC^{w/o}) induz a entrada na fase S do ciclo celular em todas as zonas do córtex adrenal (Torres et al., 2010). Além disso, a comparação entre os efeitos do peptídeo N-POMC₁₋₂₈ com as pontes dissulfeto Cys²-Cys²⁴ e Cys⁸-Cys²⁰ (N-POMC^w) e o peptídeo N-POMC^{w/o} mostraram que o fragmento N-POMC^w tem um efeito mitogênico somente nas células das zonas Glomerulosa e Reticulada, e um provável envolvimento da proteína ciclina E (Mendonça e Lotfi, 2011).

1.7 O Hormônio Adrenocorticotrópico, ACTH

O ACTH, produzido e secretado na hipófise anterior, é um hormônio peptídico de cadeia simples composto por 39 aminoácidos dos quais os 24 primeiros aminoácidos são essenciais e têm a mesma sequência em todos os mamíferos. A porção biologicamente ativa do ACTH está compreendida nos 18 primeiros aminoácidos NH₂-terminais e a meia-vida do ACTH circulante é de cerca de 4 - 8 minutos, mas pode variar conforme o método de dosagem.

O ACTH liga-se a receptores transmembrânicos de sete hélices acoplados a proteína G. Esse receptor é específico da célula suprarrenal e pertencente à família dos receptores de melanocortina, *Melanocortin 2 Receptor* (MC2R). Há cerca de 3.560 moléculas de receptores MC2R em cada célula adrenocortical e o ACTH é capaz de regular positivamente sua expressão. Esses receptores ativam a enzima adenilato ciclase aumentando os níveis intracelulares de cAMP, consequentemente, ativando a cascata de sinalização via PKA. No entanto, além do cAMP, outros segundos mensageiros podem ser gerados, a partir da ativação desses mesmos receptores e com isso ativar outras vias de sinalização, que podem modular a resposta aos diversos fatores de crescimento aos quais as células estão expostas (Gutkind, 1998).

O mecanismo pelo qual o ACTH estimula as células adrenocorticais a produzirem esteroides envolve a translocação do colesterol para o interior da mitocôndria, onde a enzima citocromo P450 *side chain-cleavage* (P450_{scc}), responsável pela clivagem da cadeia lateral do colesterol, catalisa a formação de

pregnenolona. Essa é a etapa inicial da produção dos hormônios adrenocorticais, que após deixarem a mitocôndria, provavelmente por difusão passiva, se dirigem para o retículo endoplasmático onde são convertidos em desoxicorticosterona (DOC) (Simpson e Waterman, 1988). A DOC retorna para a matriz mitocondrial e dá origem à corticosterona, pela ação da enzima citocromo P450 11 β -hidroxilase (CYP11B1) nas células Fasciculadas/Reticuladas, ou à aldosterona pela ação da enzima citocromo P450 11 β -hidroxilase aldosterona sintase (CYP11B2), presente nas células Glomerulosas (Ogishima et al., 1989). Já a ação tardia do ACTH deve-se à capacidade deste hormônio em regular a expressão gênica das enzimas esteroidogênicas (Moore et al., 1991).

Apesar de a ação esteroidogênica do ACTH, via PKA, no córtex da suprarrenal já estar bem estabelecida desde 1980 (Schimmer, 1980), os efeitos do ACTH na proliferação celular e no crescimento de tumores ganharam importância mais recentemente. Ainda que numerosos estudos tenham sido executados *in vivo* e *in vitro*, os efeitos do ACTH na proliferação celular ainda são objetos de discussão e controvérsias. As evidências de que o ACTH é o principal estímulo trófico e mitogênico para o córtex adrenal *in vivo* estão baseadas, principalmente, na correlação entre os níveis de ACTH circulante com as alterações no tamanho da suprarrenal, atrofia ou hipertrofia (New, 1998). No entanto, *in vitro*, as evidências indicam efeitos contraditórios: antimitogênico (Masui e Garren, 1971; Gospodarowicz, 1975; Ramachandran e Suyama, 1975; Hornsby e Gill, 1977; Weidman e Gill, 1977; Morera e Saez, 1980; Simonian e Gill, 1981); mitogênico fraco (Arola et al., 1993; Lotfi et al., 1997) ou ainda um mitogênico indireto (Hornsby, 1984). Este conjunto de descobertas levou a concepção de que pode haver outros peptídeos, de ação parácrina, autócrina e mesmo endócrina, envolvidos no controle da proliferação da suprarrenal.

1.8 O Fator de Crescimento de Fibroblastos Tipo 2, FGF2

Dentre os fatores que podem atuar na manutenção da suprarrenal estão os fatores peptídicos de crescimento. São polipeptídeos biologicamente ativos relacionados ao controle da proliferação, diferenciação, sobrevivência celular,

quimiotaxia, adesão e migração (Bottcher e Niehrs, 2005). Dentre estes fatores, um dos mais importantes são os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), cuja expressão e função biológica estendem-se a uma série de células e tecidos incluindo o córtex da suprarrenal (Feige et al., 1998; Turner e Grose, 2010).

Os primeiros FGFs descritos foram caracterizados segundo sua atividade mitogênica. A existência, no cérebro e em extratos hipofisários, de peptídeos capazes de promover o crescimento de culturas de fibroblastos de camundongo, linhagem NIH 3T3, foi descrita inicialmente por Armelin (1973) e em culturas primárias de adrenocórtex bovina por Gospodarowicz (1975). Dessa forma, foram descritos os primeiros componentes da família dos FGFs: FGF-a (ácido) ou FGF1, e o FGF-b (básico) ou FGF2 (Gambarini e Armelin, 1982).

Yayon et al. demonstraram em 1991, que a ligação dos FGFs 1 e 2 ao seus receptores necessita de heparan sulfato. Este glicosaminoglicano complexo normalmente encontra-se ligado a proteínas formando os proteoglicanos, que se localizam tanto na membrana como na matriz extracelular. As funções biológicas atribuídas a essa interação são: armazenamento do FGF secretado, proteção contra inativação enzimática, degradação por temperatura ou pH baixo e participação na ligação dos FGFs com seus respectivos receptores (Klagsbrun e Baird, 1991).

As respostas celulares aos FGFs são mediadas por receptores de membrana com domínio citoplasmático tirosina quinase. O mecanismo de ativação dos receptores de FGF (FGFRs) leva à sua homo ou heterodimerização e autofosforilação em resíduos de tirosina específicos, formando vários sítios de ligação para proteínas reconhecedoras de fosfo-tirosina (Mohammadi et al., 1996). A família dos FGFRs é composta por cinco genes, sendo que os mais importantes para a sinalização intracelular consistem em flg (FGFR1), bek (FGFR2), flg-2 (FGFR3) e FGFR4 (Wellstein et al., 1990; Powers et al., 2000).

Cada gene, através do processamento alternativo específico, codifica múltiplas isoformas desses receptores, que podem ser secretadas (isoforma I) ou permanecer ligadas à célula (isoforma K), resultando em funções específicas dos FGFRs para cada tecido. Os FGFRs ativados por seus ligantes têm atividade mitogênica potente e alterações no padrão de expressão das isoformas, que podem resultar na formação e progressão tumoral. A principal via de sinalização ativada

pelo FGF2 é a via da proteína quinase ativada por mitogênico Ras-MAPK (Folkman e Klagsbrun, 1987; Sporn e Roberts, 1988).

1.9 As Vias de Sinalização

Quando hormônios ou fatores de crescimento se ligam aos seus receptores, eles iniciam uma cascata de sinalização, por fosforilação, que têm por finalidade, alterar a expressão de genes específicos que definem, dentre outros fenômenos, se as células irão ou não proliferar.

A superfamília das MAPKs é constituída por três famílias de proteínas quinases, as ERKs, proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares; as JNKs, quinases de c-Jun NH₂-terminal e a família de quinases p38/MAPK (Cowan e Storey, 2003). A MAPK, uma serina/treonina (Ser/Thr) quinase é ativada por uma MAPK quinase (MAPKK ou MEK), que é uma quinase que fosforila sítios Ser/Thr e Tirosina (Tyr). A MAPKK é ativada por uma MAPKK quinase (MAPKKK) que recebe sinais de receptores de superfície ativados ou proteínas ligadas a guanosina trifosfato (GTP) e/ou outras quinases. No final dessa cascata de sinalização a MAPK irá fosforilar, na maioria, proteínas nucleares como fatores de transcrição regulando, portanto, uma série de genes (Cobb e Goldsmith, 1995).

A família ERK é a mais estudada e responde, primariamente, a fatores mitogênicos. ERK1 e ERK2 são ativadas por MEK1 e MEK2 que fosforilam sítios Thr-Glu-Tyr nas ERKs. As MEKs são ativadas por c-Raf, uma MAPKKK, que por sua vez é regulada pela proteína Ras ativada por fatores de crescimento e receptores tirosina quinase. Após translocação para o núcleo, as ERKs são responsáveis pela fosforilação de ativadores de transcrição como p90^{rsk}, fatores de transcrição como Elk-1 e Ets-1, proteínas adaptadoras como Sos, receptores de fatores de crescimento e de estrógenos (Denhardt, 1996).

A família JNK é constituída de três tipos de proteínas JNK1 e JNK2, amplamente expressas em vários tecidos e JNK3, específica do tecido cerebral, coração e testículos. Essas proteínas respondem a vários estímulos de estresse como choque de temperatura, osmótico, isquemia e exposição à luz ultravioleta (UV) e ainda a citocinas. As JNKs são ativadas por fosforilação dupla no motivo Thr-Pro-

Tyr pelas JNKK1 e JNKK2, conhecidas como MAPK quinase 4 e 7 (MKK4/7). As MKK 4/7 são fosforiladas por MEKK1-4, ASK e MLK que por sua vez são ativadas por proteínas G da família Rho (Rac, Rho e Cdc42). Dímeros de JNKs ativas passam pelo envelope nuclear e são as responsáveis por fosforilar a proteína c-Jun, levando ao aumento da atividade do fator de transcrição AP-1, além da ativação de outros fatores de transcrição como ATF-2, Elk-1, Myc, Smad3 e o supressor de tumor p53. A ativação da cascata de JNK parece regular o processo de apoptose (Lin, 2003), no entanto sob certas condições pode promover a sobrevivência celular (Dougherty et al., 2002).

As proteínas p38/MAPK são fosforiladas nos sítios com motivos Thr-Gly-Tyr e são ativadas por estresse ambiental, radiação ionizante, citocinas e fator de necrose tumoral (TNF). São as MKKs 3 e 6 que fosforilam diferentes isoformas de p38/MAPK (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ e p38-2), que por sua vez, são ativadas por MEKK, MLK e ASK1, GTPases que incluem a família Rho. Cada isoforma de p38/MAPK ativa um substrato específico, por exemplo, α e β ativam proteínas heat-shock enquanto γ e δ ativam ATF-2. Outros fatores de transcrição como Stat1, complexo Max/Myc, Elk-1 e CREB também são afetados pela família das p38/MAPK e podem estar envolvidas nos fenômenos de motilidade celular, transcrição e remodelagem de cromatina (Cowan e Storey, 2003).

Outras proteínas sinalizadoras podem ser ativadas após estimulação com ACTH e FGF2, por exemplo Akt, também conhecida como PKB, que é uma proteína quinase com papel importante no controle do equilíbrio entre apoptose e sobrevivência celular (Franke et al., 1995). Akt é ativada por fosfoinositol 3 quinase (PI3K), por fosforilação no sítio Thr-308 e Ser-473, após estímulos com insulina e vários fatores de crescimento como FGF2 e PDGF. Os fatores de sobrevivência podem suprimir a apoptose de uma maneira independente de transcrição ativando Akt, que então, fosforila e inativa componentes da maquinaria apoptótica incluindo Bad, fatores de transcrição Forkhead e Caspase-9 (Brunet et al., 1999). O desacoplamento entre sobrevivência e mitogênese pode ser explicado pelas diferentes habilidades dos agentes mitogênicos em induzir eficientemente a via de sinalização PI3K/PKB/Akt (Kennedy et al., 1997).

1.10 As Vias de Sinalização Ativadas pelo ACTH

Na década de 80, Schimmer (1980) demonstrou que a via PKA é por excelência a via utilizada para a ação esteroidogênica do ACTH no córtex da suprarrenal. A PKA tem como um de seus alvos o fator de transcrição CREB que estimula a transcrição de certos genes após ser fosforilado em um resíduo de Ser-133. A família CREB tem um papel importante no desenvolvimento, diferenciação e proliferação dos tecidos endócrinos sendo composta por três membros: CREB, CREM e ATF-1 (Rosenberg et al., 2002).

Análises da ação esteroidogênica do ACTH na linhagem de células de carcinoma adrenocortical de camundongo, Y1, revelaram que a ativação da proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídeos (PKC) é capaz de deflagrar a primeira fase da esteroidogênese estimulada por ACTH, mas não a segunda fase, que depende estritamente da ativação de PKA (Frigeri e Armelin, 1996). A PKC é uma Ser/Thr quinase ativada intracelularmente por vias de transdução de sinal que produzem diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidil inositol bi-fosfato (PIP2) e fosfatidilcolina pela ação de diversas fosfolipases. Foram identificadas pelo menos 11 isoformas de PKC que diferem quanto à estrutura primária, distribuição tecidual, localização subcelular, resposta a fatores extracelulares e especificidade de substrato. As isoformas podem ser separadas em três subfamílias. Os membros da primeira família requerem Ca^{+2} e fosfolipídeos e incluem PKC α , βI , βII e γ . A segunda família tem membros independentes de Ca^{+2} e dependentes de fosfolipídeos, e incluem PKC δ , ϵ , η e θ . Membros da terceira família não são ativados nem por DAG nem por ésteres de forbol e incluem PKC ξ , μ e τ . Porém, fosforilação parece ser um mecanismo importante para a regulação de todas as PKCs. As PKCs atuam na regulação da transformação celular, crescimento, diferenciação, tráfego de vesículas, apoptose e expressão gênica.

Apesar do avanço nos estudos que mostram as redes de sinalização intracelular e o efeito biológico em linhagens adrenocorticais tumorais como a Y1 e a NCI-H295 após estimulação com ACTH, FGF2 e com o peptídeo N-POMC₁₋₂₈ (Fassnacht et al., 2003; Schimmer et al., 2007; Costa et al., 2008; Parmar et al.,

2008; Pepper e Bicknell, 2009), pouco se sabe a respeito das vias de sinalização estimuladas por esses fatores e da resposta biológica em células normais do córtex da suprarrenal, isto é, células sem desvios. Considerando-se, ainda, a existência do paradigma não completamente solucionado da ação do ACTH *in vivo* (mitogênico) e *in vitro* (antimitogênico ou mitogênico fraco), e com isso a possibilidade do ACTH ser um mitogênico indireto *in vitro*, isto é, cuja ação pode ser dependente, por exemplo, de fatores parácrinos como o FGF2 e de outros peptídeos como o N-terminal da POMC, tivemos como hipótese que outras vias, além daquelas já descritas, poderiam ser importantes para desencadear a resposta mitogênica na suprarrenal, como as exemplificadas na Figura 6. Assim, traçamos os seguintes objetivos para testar esta hipótese.

Figura 6: Esquema simplificado das vias de sinalização analisadas.
 FONTE: Adaptado de Liu et al., 2007.

2 OBJETIVOS

2.1 Caracterizar o aspecto morfológico e enzimático dos tipos celulares isolados após o processamento das glândulas suprarrenais de rato, para a obtenção das culturas de células primárias.

2.2 Analisar a ativação das vias de sinalização MAPK (ERK, JNK, p38), PKA/PKC/CREB e PI3K/PKB/Akt em células tratadas com ACTH, FGF2 e 1-28 N-terminal da POMC (N-POMC₁₋₂₈) em culturas primárias de células adrenocorticais de rato, células Glomerulosas (G) e células Fasciculadas/Reticuladas (F/R) pelo método de *immunoblotting*.

2.3 Avaliar o efeito biológico promovido pelos tratamentos com ACTH, FGF2 e N-POMC₁₋₂₈ em culturas primárias de células adrenocorticais de rato, células G e F/R, utilizando ensaios de viabilidade e proliferação (MTS, corante vital azul de tripan), morte celular (Anexina V/ IP), senescência (β -galactosidase) e autofagia (expressão de LC3B).

2.4 Descrever as alterações promovidas pela inibição farmacológica e da expressão gênica, utilizando RNA de interferência, das vias de sinalização estimuladas pelo ACTH, FGF2 e N-POMC₁₋₂₈ em células G e F/R, no efeito biológico promovido por esses peptídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Peptídeos

Neste trabalho foi utilizado o hormônio adrenocorticotrófico com 39 aminoácidos **COOH**-Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-**NH₂** (ACTH₁₋₃₉) humano sintético ≥97% (HPLC) (A0423, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) em concentrações fisiológicas e farmacológicas: 0,001 - 100 nM.

O fator de crescimento de fibroblastos do tipo 2 ou básico (FGF2 ou FGF-b) bovino recombinante, gentilmente doado pelo Prof. Dr. Ângelo Geraldo Gambarini, Instituto de Química – Departamento de Bioquímica – USP, ou humano recombinante sintetizado em *Escherichia coli* ≥97% (SDS-PAGE) (F0291, Sigma-Aldrich) foram utilizados em concentrações entre 0,05 e 1 nM. Experimentos de dose-resposta com as concentrações de 0,025, 0,05, 0,25, 0,5 e 1 nM com a linhagem de células adrenocorticais de camundongo Y1 demonstraram que acima de 0,5 nM a resposta da expressão da proteína c-Fos e da taxa de incorporação de BrdU não se alteram, caracterizando como saturantes as concentrações superiores a esta (Lotfi e Armelin, resultados não publicados).

Foram sintetizadas duas formas do peptídeo N-POMC₁₋₂₈ **COOH**-Trp-**Met**-Leu-Glu-Ser-Ser-Gln-**Met**-Gln-Asp-Leu-Thr-Thr-Glu-Ser-Asn-Leu-Leu-Ala-**Met**-Ile-Arg-Ala-**Met**-Arg-Lis-Asp-Leu-**NH₂**, com e sem pontes dissulfeto, e pelo menos duas reações de síntese diferentes foram feitas para a mesma sequência peptídica. O peptídeo N-POMC₁₋₂₈ sem as pontes dissulfeto (N-POMC^{w/o}) foi sintetizado pelo laboratório da Profa. Dra. Maria Aparecida Juliano, do Departamento de Biofísica e Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Para evitar a formação incorreta das pontes dissulfeto e, além disso, manter a molécula de enxofre, os resíduos contendo as cisteínas (Cys) nas posições 2, 8, 20 e 24 foram substituídos por metioninas (Met). Também foi sintetizado um peptídeo com as pontes dissulfeto (N-POMC^w) entre as cisteínas 2 - 24 e 8 - 20 (Bachem America Inc., Torrance, CA, EUA). Estes peptídeos foram utilizados em concentrações variando entre 0,01 nM a 10 µM.

3.2 Cultura Primária de Suprarrenal de Rato

Os procedimentos utilizados estão descritos no Protocolo para uso de animais em experimentação atualmente registrado sob nº 83 na folha 90 do livro 02 de 10/08/2010, sobre o projeto intitulado “Estudo do ciclo celular de células da suprarrenal de rato em cultura de células primárias”, que está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

O protocolo de obtenção das culturas primárias de suprarrenal de rato foi adaptado de Gallo-Payet et al. (1990) e está descrito em Mattos e Lotfi (2005). Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Sprague Dawley, entre 50 e 60 dias de idade pesando cerca de 250 e 300 g, mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, em gaiolas com 4 - 5 animais, sob condições controladas de luz (12 h/12 h, início do claro às 7 h), ar e temperatura (22 °C) e com livre acesso à ração e água.

Os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina entre 7 e 9 h da manhã. Fez-se uma incisão ventral mediana profunda no abdômen, prolongando-se o corte no sentido do tórax em ambos os lados (Figura 7A). O intestino foi rebatido, expondo a região posterior, para que as glândulas pudessem ser retiradas com pinça curva juntamente com a gordura circundante (Figuras 7B e 7C). As glândulas foram mantidas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco com baixa glicose (DMEM-low glucose) (D5523, Sigma-Aldrich) suplementado com 25 µg/ml de ampicilina (A0166, Sigma-Aldrich) e 100 µg/ml de estreptomicina (S9137, Sigma-Aldrich) até seu processamento.

Em fluxo laminar, as glândulas foram lavadas pelo menos três vezes com solução salina tamponada sem cálcio ou magnésio (PBSA), a gordura circundante foi retirada (Figuras 7D e 7E) e só então se iniciou a dissecação, que consiste em separar a cápsula, do restante da glândula. As cápsulas contendo as células Glomerulosas foram dissociadas em DMEM (1 ml/rato) com 2 mg/ml de collagenase liofilizada (17018-029, Gibco™, Grand Island, NY, EUA) e 25 µg/ml de desoxiribonuclease I de pâncreas bovino (DNase I) (DN25, Sigma-Aldrich) por 20

min a 37 °C e 5% de CO₂. O restante da glândula, composto pelas zonas Fasciculada, Reticulada e medula, após ser reduzido a pequenos pedaços, foi digerido por 4 mg/ml de collagenase liofilizada e 25 µg/ml DNase I em DMEM (1 ml/rato) por 40 min, a 37 °C e 5% de CO₂. Após a digestão enzimática, as soluções foram ressuspensas com pipeta volumétrica graduada com movimentos suaves repetidos várias vezes ($\pm$ 40 vezes) para que ocorresse a dissociação mecânica.

As suspensões de células foram filtradas por um filtro de náilon de 100 µm (352360, BD Biosciences, Bedford, MA, EUA), para separar o material não digerido, e foram diluídas para 45 ml em DMEM e centrifugadas a 700 rpm por 12 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o *pellet* de células foi ressuspendido em DMEM + 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e as células foram plaqueadas conforme o experimento.

Figura 7: Fotos representativas do protocolo de obtenção das suprarrenais e dissecação. **A:** abdome exposto de rato macho adulto Sprague Dawley, **B:** suprarenal direita *in situ*, **C:** suprarenal esquerda *in situ*, **D:** suprarenal direita; **E:** suprarenal esquerda.

3.3 Imunocitoquímica para Expressão de Tirosina Hidroxilase, Coloração de Hematoxilina e Eosina e *Oil Red O*

Uma das enzimas-chave na marcação de células medulares cromafins é a tirosina-hidroxilase (TH) que converte o precursor tirosina em diidroxifenilalanina (DOPA) (Stewart, 2008). Há uma grande variedade de linhagens de células medulares, sendo as mais úteis, aquelas derivadas a partir de células de origem cromafim. A linhagem PC12 de rato é o padrão de linhagem adrenomedular. Foi a primeira a ser estabelecida a partir de um feocromocitoma adrenal transplantável de rato (Greene e Tischler, 1976), que respondeu ao fator de crescimento neural (NGF) com a perda reversível da atividade mitótica e diferenciação para um fenótipo neuronal (Eaton e Duplan, 2004).

A coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) é uma das principais técnicas de coloração de tecidos em histologia e de células na citologia. Por meio desta técnica podemos diferenciar entre regiões basófilas e acidófilas devido as distintas afinidades por componentes básicos (histonas, núcleo, nucléolo e retículo endoplasmático rugoso) ou ácidos (citoplasma) pela hematoxilina e a eosina, respectivamente (Junqueira e Carneiro, 2004).

O *Oil Red O* ($C_{26}H_{24}N_4O$) é um corante solúvel em gordura utilizado para detecção e marcação de triglicerídeos neutros, lipídeos e algumas lipoproteínas em cortes histológicos e células fixadas. Tem a aparência de um pó vermelho com absorbância máxima em 518 nm. O *Oil Red O* substitui amplamente o Sudan III e o Sudan IV, produzindo uma coloração vermelha muito mais intensa, tornando as marcações mais facilmente visíveis (Koopman et al., 2001).

Aproximadamente 2×10^4 células G, F/R, PC12 ou NIH 3T3 Clone A31 foram plaqueadas em lamínulas plásticas ThermanoxTM Coverslips (174950, Nalge Nunc International, Rochester, NY, EUA) em DMEM + 10% SFB. Após 48 h do plaqueamento, as células em lamínulas foram lavadas com PBSA e fixadas em 3,7% formaldeído (104003, Merck, Darmstadt, Alemanha) diluído em PBSA, a temperatura ambiente, por 25 a 30 minutos .

Para o protocolo de imunocitoquímica, as células foram hidratadas com PBSA e permeabilizadas com 0,1% Nonidet P-40 (19628, USB, Cleveland, OH, EUA) por

20 minutos. As proteínas inespecíficas foram bloqueadas com um soro normalizador diluído em PBSA com 0,3% Triton (22686, USB) por 1 h em temperatura ambiente. Após este período, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal específico de rato para tirosina hidroxilase (22941, ImmunoStar, Hudson, WI, EUA), produzidos em camundongos, diluídos em uma solução de PBSA + 0,3% de Triton + 1 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) (A7888, Sigma-Aldrich), na titulação de 1:1000, e incubados em câmara úmida a 4 °C por no mínimo 12 horas. Nas lamínulas controle, foi utilizado soro de cavalo normal ao invés do anticorpo específico.

Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBSA e incubadas em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário biotilado anti-camundongo do kit Vectastain Elite ABC (PK-6102, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na titulação de 1:1000 diluído em PBSA + 0,3% Triton + 1,5% de soro normalizador. Após 3 lavagens em PBSA, as lamínulas foram incubadas com o complexo avidina-biotina (Vector) por 1 h. A revelação da proteína foi feita com extrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) (D4418, Sigma-Aldrich) por 30 segundos. Com isso é formado um precipitado de coloração marrom no local onde se encontra a proteína. As células foram, então, contracoradas com hematoxilina de Harris (115938, Merck) e diferenciadas com carbonato de lítio saturado (105671, Merck). A montagem das lamínulas em lâminas foi feita com óleo mineral Nujol (Schering-Plough). Para o cálculo da porcentagem de células marcadas foram utilizadas duas preparações de culturas independentes. Foram contadas cerca de 4.000 células por experimento em seis campos aleatoriamente escolhidos. As imagens foram capturadas em microscópio de luz Nikon Eclipse 80i com câmera digital DXM1200C (Nikon, Chiyoda-ku, Tóquio, Japão).

Para o protocolo de coloração com H&E as lamínulas foram submersas em uma solução de hematoxilina de Harris (Merck) por 30 s, lavadas em água destilada, em seguida foram submersas em solução de Eosina de Putt (115935, Merck) por 1 min, lavadas em água destilada e montadas. As imagens foram capturadas em microscópio de luz Nikon.

Para o protocolo de coloração de vesículas lipídicas com *Oil Red O*, as lamínulas foram lavadas por 2 min com isopropanol 60% (109634, Merck) e, em

seguida, incubadas por 30 min em uma solução de uso de *Oil Red O* [3:2 de solução-estoque ORO em água milli-Q; solução estoque: 1,4 g de *Oil Red O* (O-0625, Sigma-Aldrich) em 400 ml de isopropanol 99%]. Seguiu-se uma lavagem rápida com isopropanol 60% e diversas lavagens com água milli-Q. As células foram, então, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 50 segundos e diferenciadas com carbonato de lítio saturado. A montagem das lamínulas em lâminas foi feita com glicerol 10% (104094, Merck) em PBS. As imagens foram capturadas em microscópio de luz Nikon.

3.4 Efeitos Biológicos

3.4.1 Análise da Proliferação Celular Através de Ensaio de Viabilidade

O azul de tripan (111732, Merck) é um corante vital. Sua reatividade está baseada no fato de que este corante tem carga negativa e não interage com as células a menos que a membrana celular esteja danificada, portanto, cora somente células não-viáveis cujas membranas celulares estão permeáveis pela perda de sua integridade. Assim, após 10 min de incubação, é possível diferenciar as células coradas/não-viáveis e não-coradas/viáveis (Freshney, 2005).

As células da cultura primária F/R e G foram plaqueadas em placas de 24 poços Falcon Primaria Easy Grip™ (353847, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA) ($1,4 \times 10^5$ células G por poço; $1,6 \times 10^5$ células F/R por poço). Após 24 h, as células foram carenciadas para soro em DMEM + 0,5% SFB e tratadas, de forma sustentada, ou ainda não tratadas conforme a Figura 8. Após o tratamento, as células foram ressuspensas em 0,4% azul de tripan, para contagem de 3 poços/dia/tratamento de cada tipo celular, em hemocitômetro, do número de células viáveis e células não-viáveis. Foram realizados quatro experimentos preparados de diferentes culturas primárias.

A aplicação dos tratamentos, em todos os testes de efeito biológico, se deu de forma sustentada, ou seja, as células quantificadas em 24 h receberam uma única aplicação às 0 h, já as células quantificadas em 48 h receberam duas

aplicações (uma em 0 h e outra em 24 h), enquanto que as células quantificadas em 72 h receberam três aplicações (uma em 0 h, outra em 24 h e mais uma em 48 h).

Figura 8: Protocolo de análise da cinética de proliferação das células G e F/R tratadas com ACTH 0,001 - 1 nM ou não tratadas (Controle = 0,5%SFB) utilizando o corante vital 0,4% azul de tripan; tratamentos de 24, 48 e 72 h.

3.4.2 Análise da Proliferação Celular Através de Ensaio Colorimétrico

O MTS CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (G5430, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) é um método colorimétrico de determinação do número de células viáveis em ensaios de sobrevivência e citotoxicidade. O reagente contém o componente MTS tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium *inner salt* MTS] e um reagente acoplador de elétrons (fenazina etosulfato; PES). O componente MTS tetrazolium (reagente de Owen) inicialmente amarelo é bio-reduzido, pelas células, em um produto de tom castanho, o formazan, que é solúvel no meio de cultura. O responsável por essa conversão é o NADPH ou NADH produzido pelas enzimas dehidrogenases das células metabolicamente ativas. A quantidade de formazan produzido, medida pelo grau de absorbância à 490 nm, é proporcional ao número de células vivas na cultura. O MTS pode ser considerado uma avaliação indireta de proliferação, pois com esse método não se conta o número de células em si, mas uma consequência do aumento no número de células que é o aumento na formação de formazan em função do tempo e, portanto do grau de absorbância (Cory et al., 1991).

As células da cultura primária F/R e G foram plaqueadas em placas de 96 poços Falcon Primaria Easy Grip™ (353872, Becton Dickinson) 3×10^4 células G ou F/R por poço) em DMEM + 10% SFB. Após 24 h, as células foram carenciadas para soro em DMEM + 0,5% SFB por mais 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas (seguindo o protocolo de tratamento sustentado) com SFB, ACTH, FGF2 ou N-POMC₁₋₂₈ em diferentes concentrações ou ainda não tratadas por 24, 48 e 72 horas conforme a Figura 9.

Para a quantificação, adicionou-se 20 µl do reagente, em 100 µl de meio de cultura existente em cada poço da placa contendo as células e incubou-se a placa por 4 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A reação foi quantificada por absorbância a 490 nm usando um leitor de placa de 96 poços (Absorbance Microplate Reader ELx800, Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA). Foram realizados de três a cinco experimentos, preparados de diferentes culturas primárias, em triplicatas ou quintuplicatas.

Figura 9: Protocolo de análise da cinética de proliferação das células G e F/R tratadas com ACTH 0,001 - 100 nM, FGF2 0,05 - 1 nM, N-POMC₁₋₂₈ 0,01 - 10 µM e SFB 10% ou não tratadas (Controle = 0,5%SFB) utilizando o reagente MTS; tratamentos de 24, 48 e 72 h.

3.4.3 Análise da Senescência Através do Método da β -galactosidase (SA- β -gal)

Uma das características que define a maioria das células normais é sua limitada capacidade replicativa que culmina na senescência celular, um estado estacionário no qual as células permanecem viáveis, mas demonstram padrões alterados de expressão gênica e proteica. Células senescentes são incapazes de entrarem em divisão com acréscimo de soro ou com subcultivos em cultura, apresentando um perfil de dano celular que difere da maioria dos outros tipos de injúrias ou inibição por contato: tamanho celular aumentado e atividade pH-dependente da β -galactosidase (Campisi, 2005).

A β -galactosidase também denominada de beta-gal ou β -gal é uma enzima lisossomal, uma hidrolase ácida, que catalisa a hidrólise de β -galactosídeos em monossacarídeos. A atividade da β -galactosidase em pH 6,0 está presente somente em células senescentes não sendo encontrada em células pré-senescentes, quiescentes ou imortalizadas. Na presença da β -galactosidase o substrato X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosídeo) é hidrolisado e muda sua cor para azul devido a formação do 5-bromo-4-cloro-3-indol (Lee et al., 2006).

Células da cultura primária G e F/R foram plaqueadas em placas de Petri de 35 mm Falcon Primaria Easy Grip™ (353801, Becton Dickinson) 1×10^4 células/placa em DMEM + 10% SFB. Após 24 horas do plaqueamento, foram carenciadas para soro em DMEM + 0,5% SFB ou mantidas em DMEM + 10% SFB. Após 24 h do carenciamento foram estimuladas com ACTH 1 e 100 nM (seguindo o protocolo de tratamento sustentado) ou ainda não tratadas (Controle = 0,5% SFB) por 24, 48 e 72 horas (Figura 10).

Baseado no protocolo descrito por Dimri et al. (1995) com modificações, as células após o tratamento foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 a 37 °C, fixadas com glutaraldeído 0,5% preparado em PBS pH 7,2 por 5 minutos à temperatura ambiente, em seguida foram lavadas duas vezes com PBS pH 6,0 suplementado com 1 mM $MgCl_2$ e incubadas *overnight* a 37 °C, sem CO_2 e protegidas da luz, com solução corante *senescence-associated* β -Gal (SA- β -Gal) feita na hora e filtrada em filtro de 0,45 μ m: 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-galactopiranosídeo (X-Gal) (V3941, Promega), 0,12 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,12 mM

$K_4Fe(CN)_6$, 1 mM $MgCl_2$ (Merck) em PBS pH 6,0. A marcação de SA- β -Gal é evidente em 2 a 4 horas e é máxima entre 12 e 16 horas. Após o período de incubação as células foram lavadas uma vez com PBS pH 6,0 e mantidas entre 2 e 8 °C indefinidamente.

Figura 10: Protocolo de análise da cinética de senescência das células G e F/R tratadas com ACTH 1 e 100 nM, SFB 10% ou não tratadas (Controle = 0,5%SFB) utilizando a coloração SA- β -gal; tratamentos de 24, 48 e 72 h.

Os resultados foram apresentados na forma de gráficos da porcentagem de células marcadas em relação ao número total de células contadas em microscópio invertido de contraste de fase (~100 células/tratamento). As células em senescência apresentam marcação azul-clara somente no citoplasma e tamanho aumentado em quatro a cinco vezes em relação a uma célula normal/controle. Foram realizados três experimentos preparados de diferentes culturas primárias.

3.4.4 Análise da Autofagia Através da Expressão da Proteína LC3B

Descrita desde a década de 50, a autofagia ou autofagocitose é um processo catabólico que envolve a degradação dos componentes celulares através da maquinaria lisossomal. É um processo finamente regulado que tem papel importante no crescimento normal, desenvolvimento e homeostase, ajudando a manter o equilíbrio entre síntese, degradação e subsequente reciclagem de produtos celulares e organelas. É o principal mecanismo pelo qual uma célula desnutrida desvia

nutrientes de processos desnecessários para processos mais essenciais e/ou basais. O mecanismo autofágico é iniciado pela formação de uma membrana que envolve a região ou organela-alvo sequestrando organelas ou porções do citosol do restante do citoplasma, formando os autofagossomos. A vesícula resultante se funde com um lisossomo que através da ação de hidrolases ácidas residentes degradam seu conteúdo. A autofagia é aumentada em resposta a sinais ou estresses intra e extracelulares como desnutrição, privação de fatores de crescimento e estresse de retículo. Os defeitos no processo autofágico têm papel significativo em patologias humanas como o câncer, neurodegeneração e doenças infecciosas por patógenos intracelulares (Stromhaug e Klionsky, 2001).

A proteína **Cadeia Leve 3** (Light Chain 3 = LC3) utilizada como marcador de autofagia em células animais, foi originalmente identificada como uma subunidade das proteínas associadas a microtúbulos 1A e 1B (Microtubules Associated Proteins = MAP1LC3), subsequentemente foi demonstrada sua similaridade com as proteínas Apg8/Aut7/Cvt5 críticas para autofagia em levedura. Em humanos, há três isoformas das proteínas LC3: LC3A, LC3B e LC3C que passam por modificações pós-traducionais durante a autofagia. As proteínas LC3 são primeiramente clivadas na extremidade carboxi-terminal imediatamente após sua síntese para dar origem a uma forma citosólica LC3-I. Durante a autofagia LC3-I é convertida em LC3-II através de lipidação por um sistema semelhante a ubiquitina envolvendo Apg7 e Apg3 que permite a LC3 se associar às vesículas autofágicas. A presença de LC3 nos autofagossomos, assim como a conversão de LC3 para a forma de baixa migração LC3-II, têm sido usadas como indicadores de autofagia (He e Klionsky, 2009).

Para a análise da indução de autofagia, as células G e F/R foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm Falcon Primaria Easy Grip™ (353802, Becton Dickinson) (9×10^5 células/placa). Após 24 h, as células tiveram seu meio trocado por meio fresco DMEM + 10% SFB ou foram carenciadas para soro em DMEM + 0,5% SFB (por 24 horas). Posteriormente, as células foram tratadas com 1 nM ACTH, Solução de Krebs-Ringer [120 mM NaCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 , 1,3 mM NaH_2PO_4 , 1 mM D-glucose, 0,2 mM MgCl_2 , 4,5 mM KCl (Merck)] ou não tratadas por 4 e 24 h. Após o tratamento as células foram lisadas com: tampão de lise RIPA (Tris-

HCl 50 mM; NP40 0,5%; NaCl 150 mM; EDTA 0,1 mM) acrescido de inibidores de proteases e fosfatases (Ortovanadato 1 mM; PMSF 1 mM; Aprotinina 2 µg/ml; Pepstatina 2 µg/ml; Leupeptina 2 µg/ml, Sigma-Aldrich). Uma alíquota de 50 µg foi aplicada em um gel de poliacrilamida-SDS 15% para a separação de proteínas. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (RPN303D Hybond-ECL, GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) em um Sistema de Transferência Semi-Dry Bio-Rad (170-3940, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) (20 V por 50 min).

As membranas foram incubadas por 1 h em TBST (Tris Buffer Solution e 1% de Tween20) + 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) para o bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida, as membranas foram incubadas, *overnight* sob agitação, em câmara fria a 4 °C com o anticorpo primário anti-LC3B (2775, Cell Signaling Inc., Danvers, MA, EUA), que reconhece a proteína total de LC3B com maior afinidade pela isoforma LC3B-II, sendo que atividade cruzada com outras isoformas de LC3 pode ocorrer. Por último, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho (7074, Cell Signaling) por 1 h à temperatura ambiente sob agitação. Segue-se o protocolo padrão de revelação e quantificação de *immunoblotting* como descrito no item 3.5.2.

3.4.5 Análise da Apoptose Através da Ligação de Anexina V

A anexina V é uma proteína de 35 KDa que, na presença de cálcio, se liga com alta afinidade aos resíduos de fosfatidilserina expostos na camada externa da membrana plasmática devido aos estímulos pró-apoptóticos. Uma abordagem para a quantificação da anexina V é a sua análise através de citometria de fluxo (FACS). Esse método permite a quantificação eletrônica da apoptose em um grande número de células (10 – 20000 células/amostra) e pode ser usado em conjunto com outros corantes fluorescentes nucleares como iodeto de propídeo (IP), que detecta mudanças nucleares e de membrana decorrentes do processo necrótico (van Engeland et al., 1998; Koopman et al., 1994).

As células G e F/R da cultura primária foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro Falcon Primaria Easy Grip™ (353802, Becton Dickinson) 5 × 10⁵ células/placa em DMEM + 10% SFB. Após 24 horas, as células foram

carenciadas para soro em DMEM + 0,5% SFB ou foram mantidas em DMEM + 10% SFB. Vinte e quatro horas após o carenciamento as células foram estimuladas com ACTH 100 nM e 1 nM, seguindo o protocolo de tratamento sustentado, ou ainda não tratadas (Controle = 0,5% SFB) por 24, 48 e 72 horas (Figura 11), e então submetidas ao protocolo para anexina V.

Figura 11: Protocolo de análise da apoptose induzida por ACTH 100 nM e 1 nM em células G e F/R da cultura primária utilizando o kit Vybrant Apoptosis Assay Kit #2; tratamentos de 24, 48 e 72 h.

Após a obtenção de um *pellet* de células, adicionou-se 100 µl do tampão de ligação de anexina 1× (25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4, 0,1% BSA), 5 µl de Alexa Fluor-488 Anexina V (V13241, Molecular Probes – Invitrogen, Eugene, OR, EUA), e 1 µl de 100 µg/ml iodeto de propídeo em cada amostra e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz, de acordo com as instruções do fabricante e estas foram analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson) nos filtros FL1-H (Anexina) e FL3-H (Iodeto de Propídeo).

Nesse protocolo, a população de células vivas foi definida como células não-marcadas, necrose como células marcadas somente com iodeto de propídeo e a apoptose foi definida como células marcadas somente com anexina (apoptose precoce) ou duplamente marcadas (apoptose tardia). Os resultados foram expressos em gráficos de densidade, com a porcentagem de células marcadas em cada campo/quadrante estabelecido (Figura 12). Foram realizados quatro experimentos preparados de diferentes culturas primárias.

Figura 12: Esquema do gráfico de densidade resultante da análise das células por citometria de fluxo.

3.5 Immunoblotting

3.5.1 Preparação do Lisado Celular

As células F/R e G foram plaqueadas em placas de Petri 35 mm ou 60 mm de diâmetro especiais para culturas de células primárias Falcon Primaria Easy Grip™ (353801 ou 353802, Becton Dickinson). Após 24 h, as células foram carenciadas para soro em DMEM + 0,5% SFB por 24 horas. Após o carenciamento as células foram tratadas com ACTH 100 nM e 1 nM, ou FGF2 0,05 - 1 nM, ou tratadas com peptídeo N-POMC₁₋₂₈ de rato 0,01 - 10 µM, tratamentos conjuntos de ACTH + FGF2 ou ainda não tratadas. Após o tratamento, as células foram lisadas com tampão de lise RIPA (TrisHCl 50 mM; deoxicolato de sódio 0,5%; NP40 1%; NaCl 150 mM; SDS 0,1%; NaF 50 mM) mais inibidores de proteases e fosfatases (Ortovanadato 1 mM; PMSF 1 mM; Aprotinina 2 µg/ml; Pepstatina 2 µg/ml; Leupeptina 2 µg/ml).

As células foram raspadas e homogeneizadas e o lisado recolhido, clareado por centrifugação a 14.000 rpm à -4 °C, por 15 min, aliqotado e estocado imediatamente em freezer a -80 °C. A quantificação da proteína total foi realizada com 10 µl do lisado mais 990 µl de solução de Bradford (500-0006, Bio-Rad) diluído (1:4 em água milli-Q) e quantificada em espectrofotômetro (UVmini1240, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) em comprimento de onda de 595 nm. Como padrão de

calibração do aparelho e das amostras foi utilizada uma curva de concentrações definidas de BSA (Sigma-Aldrich).

As amostras quantificadas de proteínas foram adicionadas a uma solução tampão (tampão de amostra: Tris-HCl pH 6,8, glicerol, SDS, β -mercaptoetanol e azul de bromofenol) e desnaturadas a 100 °C por 5 min antes de serem aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) à 10 ou 15%. Foi utilizado um padrão de peso molecular para identificação das bandas (SM0671, Fermentas Gmbh, Opelstrasse, St.Leon-Rot, Alemanha). As proteínas retidas no gel e separadas conforme o peso molecular foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de Transferência Semi-Dry por 60 min a 20 V com tampão de transferência pH 8,3 (Tris base, SDS, glicina e 20% metanol). As membranas foram coradas com uma solução de Ponceau (115927, Merck), para avaliar a eficiência da transferência e, em seguida, lavadas com água milli-Q.

3.5.2 Reação com o Anticorpo de Interesse

As membranas foram incubadas por 1 a 3 horas (dependendo do anticorpo utilizado) em TBST (Solução Tampão de Tris: Tris-HCl pH 7,4, NaCl e Tween20 1%) + 5% de leite desnatado para o bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida, as membranas são incubadas, *overnight* sob agitação, em câmara fria (4 °C) com o anticorpo primário: ERK, Phospho-ERK (Thr202/Tyr204), p38, Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), JNK, Phospho-JNK (Thr183/Tyr185), CREB, Phospho-CREB (Ser133), Akt e Phospho-Akt (Ser 473) da Cell Signaling ou Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), que reconhecem as formas fosforiladas ou não-fosforiladas (proteína total) além dos anticorpos anti-tirosina hidroxilase (ImmunoStar) e anti-P450 citocromo 11 β -hidroxilase (Chemicon, Temecula, CA, EUA) para reconhecimento de células medulares e corticais, respectivamente, e β -Tubulina, GAPDH ou β -actina (Santa Cruz) para confirmar aplicação equivalente de proteína total de todas as amostras.

Por último, as membranas são incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho, anti-camundongo ou anti-cabra Cell Signaling, Santa Cruz ou Amersham (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra, Reino

Unido) por 1 h à temperatura ambiente sob agitação. O anticorpo secundário é um conjugado de IgG com peroxidase-streptavidina (*HRP labelled streptavidin bridge system*). Para revelação usa-se o Kit ECL-Plus (GE Healthcare) como substrato que utiliza Luminol, que depois de degradado pela enzima do anticorpo secundário emite luz e impressiona uma chapa de raios X T-MAT G/RA (Carestream Health Inc., Rochester, NY, EUA) (Figura 13).

Os filmes foram revelados, fixados (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA), lavados e secos. As bandas das chapas de raios X foram analisadas utilizando um sistema de captura de imagem Gene Snap 6.05 (SynGene-Synoptic Ltd, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) e quantificadas pelo programa Gene Tools 3.06 (SynGene-Synoptic) e os resultados apresentados em gráficos. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes com preparações de culturas primárias diferentes por tratamento.

Figura 13: Protocolo de tratamento, preparação do lisado, eletroforese e *immunoblotting*.

3.6 Inibição das Vias de Sinalização

3.6.1 Inibidores Farmacológicos

Em experimentos de inibição das vias de sinalização, 30 minutos antes dos tratamentos, as células foram incubadas com:

O inibidor da via ERK, **U0126** (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofenilthio] butadieno) (9903, Cell Signaling) por ser um inibidor altamente seletivo de MEK. É capaz de inibir tanto MEK1 quanto MEK2 enquanto PD98059 inibe preferencialmente MEK1. U0126 e PD98059 ligam-se a estas proteínas de uma maneira mutuamente exclusiva sugerindo que eles compartilham o mesmo sítio de ligação. Este inibidor não interfere na atividade de outras proteínas quinases como Raf, MEKK, ERK, JNK, MKK3, MKK4/SEK1, MKK6, CDK2 ou CDK4. Foi utilizado na concentração de 10 μ M (Favata et al., 1998).

O inibidor da via p38/MAPK, **SB203580** [4-(4'-fluorofenil)-2-(4'-metilsulfonilfenil)-5-(4'-piridil) imidazol] (PHZ1253, Biosource, Camarillo, CA, EUA) é um inibidor específico, seletivo e permeável das p38/MAPK isoformas p38 α , p38 β e p38 β 2. Atua como um inibidor competitivo de ligação de ATP. Os valores de IC₅₀ variam de 21 nM a 1 μ M. Por não apresentar efeito significativo na atividade de ERKs ou JNKs é utilizado para estudos do papel fisiológico e alvos de p38/MAPK. Foi utilizado na concentração de 5 μ M (Otis et al., 2005).

O inibidor de JNK **SP600125** (420119, Calbiochem/EMD Chemicals Inc./Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado na concentração de 10 μ M. Trata-se de um inibidor de JNK potente, permeável à célula, seletivo e reversível (IC₅₀ = 40 nM para JNK-1 e JNK-2 e 90 nM para JNK-3). A inibição é competitiva com relação ao ATP e exibe uma seletividade 300 vezes maior por JNK do que por ERK e p38/MAPK. Inibe a fosforilação de c-Jun e bloqueia a expressão de IL-2, IFN- γ , TNF- α e COX-2 (Forti et al., 2002; Otis et al., 2005).

O inibidor da via de PI3K/PKB/Akt é a **Wortmanina** (sc-3505, Santa Cruz). A Wortmanina é um metabólito furanoesteroide do fungo *Talaromyces (Penicillium) wortmannii*, é um inibidor específico e covalente de PI3K que atua indiretamente em p70^{S6k} e apenas, em concentrações 100 vezes mais altas, inibe seletivamente PI4

quinase e a quinase da cadeia leve da miosina. Apresenta uma concentração inibitória *in vitro* (IC₅₀) de cerca de 5 nM, o que a torna um inibidor mais potente do que o LY294002, outro inibidor de PI3K comumente usado. Foi utilizado na concentração de 1 µM (Forti et al., 2002; Swchindt et al., 2003).

O inibidor de PKA **H-89**, *dihydrochloride* (371963, Calbiochem) é um inibidor permeável, potente e seletivo da PKA (K_i = 48 nM). É capaz de inibir outras quinases somente em concentrações muito maiores: CaM quinase II (K_i = 29,7 µM), caseína quinase I (K_i = 38,3 µM), quinase de cadeia leve da miosina (K_i = 28,3 µM), PKC (K_i = 31,7 µM) e ROCK-II (IC₅₀ = 270 nM). Foi utilizado na concentração de 1 µM (Mattos e Lotfi, 2005; Forti et al., 2006).

O inibidor de PKC, a **bisindolilmaleimida** (1559648, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha) bloqueia a atividade de PKC acoplando-se exclusivamente no sítio de ligação de ATP. A inibição máxima é obtida com concentrações de 2,5 - 5 µM, segundo Toullec et al. (1991) e mesmo na concentração máxima ele é capaz de discriminar entre PKA e PKC, inibindo apenas está última. Foi utilizado na concentração de 500 nM (Gassel et al., 2004).

O **dimetilsulfóxido (DMSO)** (D2650, Sigma-Aldrich) é um composto organo-sulfatado cuja fórmula molecular é (CH₃)₂SO. Este líquido incolor é um importante solvente polar aprótico que dissolve tanto compostos polares como apolares e é miscível em uma grande variedade de solventes orgânicos assim como em água. É menos tóxico que outros membros desta classe como dimetilformamida, dimetilacetamida e *N*-metil-2-pirrolidona. Devido ao seu excelente poder de dissolução, o DMSO é frequentemente usado como solvente para reagentes químicos analíticos. O DMSO foi utilizado como solvente dos inibidores descritos acima, sua concentração final nunca excedeu 0,1% (Novak, 2002).

3.6.2 RNA de Interferência (RNAi)

A interferência de RNA (RNAi) é uma das descobertas mais importantes da última década em genômica e proteômica funcional. Foi primeiramente descoberta em plantas, mas rapidamente foi comprovado que o RNAi é utilizado pela maioria dos eucariotos *in vivo* (Bartel, 2004). Os RNAi podem ser utilizados para defesa

contra vírus, modulação da atividade de transposons e regulação gênica pós-transcricional, tornando-se uma importante ferramenta de pesquisa para silenciar a expressão de genes alvos em inúmeros organismos e tipos celulares (Mello e Conte, 2004). Os RNAs de interferência ligam-se a transcritos complementares por interações tipo pareamento de bases entre a fita antisenso de RNA sintético e o RNAm complementar endógeno. O RNAm ligado é clivado e a sua degradação sequência-específica resulta na não expressão do gene (Carthew e Sontheimer, 2009).

Devido a potente resposta antiviral deflagrada pelas células de mamíferos após introdução de RNAs longos de fita dupla (*long double-stranded RNAs*, >30 nucleotídeos), que resulta em uma inibição não-específica da síntese de proteínas pela degradação de RNAm e ativação de interferon (Elbashir et al., 2001), optamos pela transfecção de pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNAs* = siRNAs) sintéticos.

Células da cultura primária G e F/R foram plaqueadas em placas de 6 poços especiais para culturas de células primárias Falcon Primaria Easy Grip™ (353846, Becton Dickinson) (2×10^5 células/poço) em 2 ml de meio DMEM + 10% SFB. No dia seguinte ao plaqueamento as células foram lavadas em PBS para retirada de hemácias e células mortas e o meio foi trocado para DMEM (sem antibióticos) + 10% SFB. Somente após 48 h, momento em que as células atingem 70% de confluência, estas foram submetidas a um carenciamento em DMEM (sem antibióticos) sem soro por pelo menos 2 h, após este período as células foram transfectadas com 3 µl de agente transfectante siPORT Amine Transfection Agent (AM4503, Ambion, Austin, TX, EUA) ou Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (13778-150, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) ou SureFECT™ Transfection Reagent (SA-01, SABiosciences, Frederick, MD, EUA) e 50 - 100 nM de siRNA (SIR142793, SIR348780, SIR352804, Sure Silencing™ siRNA Sets for Rat, SABiosciences).

3.6.2.1 Eficiência de Transfecção

Para avaliar a porcentagem de células transfectadas com sucesso utilizamos um siRNA para GAPDH marcado com um domínio fluorescente: Silencer Cy³ labeled GAPDH siRNA human, mouse, rat (AM4649, Ambion).

Vinte e quatro horas depois da transfecção o meio foi retirado, as células foram lavadas duas vezes de 10 min com PBSA, tripsinizadas com tripsina 0,25% e ressuspensas em SFB, em seguida foram centrifugadas a 1200 rpm por 12 minutos. Após a obtenção de um *pellet* de células, este foi ressuspendido em PBS e analisado em citômetro de fluxo no filtro FL2-H (Figura 14). A porcentagem de células marcadas indica a eficiência da transfecção.

Figura 14: Protocolo para análise da eficiência de transfecção com RNA de interferência com marcador fluorescente em células G e F/R da cultura primária.

3.6.2.2 Silenciamento

Segue-se o mesmo protocolo descrito acima (3.6.2.1) com a seguinte modificação: as sequências de siRNAs utilizados não têm marcação fluorescente e são para o silenciamento específico da expressão de CREB, ERK1 e ERK2 (Tabela 1). Também foi utilizado um controle negativo com sequência sem significado (*scrambled*) que não interfere com a expressão de nenhuma sequência de RNAm celular conhecida (AM4635, Silencer Negative Control #1, Ambion ou 45-2000, Stealth RNAi Negative Universal Control High, Invitrogen).

Tabela 1 - Sequência dos siRNAs para CREB e ERK: SureSilencing™ siRNA Sets for Rat Mapk1 (ERK2/p42), Mapk3 (ERK1/p44) e Creb1 (CREB).

		Sequência (5'- 3')	G/C (%)
CREB	A	TCAGCCGGGTACTACCATCT	52,4
	B	ACAGGGAAGCAGCAAGAGAAT	47,6
	C	TGCTCCCAGTGTAACTTAGT	47,6
	D	CTGTGGATAGTGTAACTGATT	38,1
ERK1	A	CAACCACATTCTAGGTATACT	38,1
	B	AGAGGACCTAAATTGTATCAT	33,3
	C	CGACCTTAAGATCTGTGATTT	38,1
	D	CATGAGAGATGTTTACATTGT	33,3
ERK2	A	CCATGATCATACAGGGTTCTT	42,9
	B	ACCCGTACCTGGAGCAGTATT	52,4
	C	ACAGGAAGATCTGAATTGTAT	33,3
	D	GCAATGATCATATCTGCTATT	33,3

Vinte e quatro horas depois da transfecção o meio foi retirado e substituído por DMEM (sem antibióticos) + 10% SFB. Após 24 h as células foram carenciadas para soro em DMEM (sem antibióticos) + 0,5% SFB. Após 24 h de carenciamento, as células foram tratadas com ACTH 1 nM ou FGF2 0,5 nM por 15 min e preparou-se os lisados para *immunoblotting* (Figura 15). Foi avaliado o *knockdown*/silenciamento das proteínas totais CREB e ERK e a inibição da fosforilação destas proteínas.

Figura 15: Protocolo para análise da cinética de silenciamento de ERK1, ERK2 e CREB após transfecção com RNA de interferência e tratamentos com ACTH 1nM ou FGF2 0,5 nM por 15 min em células G e F/R da cultura primária.

3.6.2.3 Modulação do Efeito Biológico

Segue-se o mesmo protocolo descrito acima (3.6.2.2) com a única alteração de que as células da cultura primária G e F/R foram plaqueadas em placas de 96 poços especiais para culturas de células primárias Falcon Primaria Easy Grip™ (353872, Becton Dickinson) (2×10^4 células/poço). Após 24, 48 e 72 h de tratamentos com ACTH ou FGF2 (Figura 16), as células G e F/R foram avaliadas através de ensaios de MTS (ver item 3.4.2).

Figura 16: Protocolo dos experimentos de efeito biológico envolvendo interferência de RNA e tratamentos com ACTH 1 nM, FGF2 0,5 nM, N-POMC^w 100 nM e N-POMC^{w/o} 10 μ M em células G e F/R da cultura primária.

3.7 Análise Estatística

Após a análise de variância (ANOVA) foram feitas comparações estatísticas quanto a significância utilizando o teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer, utilizando o programa GraphPad InStat. Os resultados são apresentados na forma de média $\pm$ SD.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da Cultura Primária de Suprarrenal de Rato

A análise da coloração por hematoxilina e eosina (H&E) mostrou que a morfologia da maioria das células é epitelióide (Figuras 17A e 17B), enquanto as células fibroblastóides representam menos de 0,1% da população de células (Mattos e Lotfi, 2005). Após o plaqueamento, as células G (Figura 17A) são maiores e espalham-se mais rapidamente enquanto as células F/R são menores e permanecem em pequenos grupos (Figura 17B). O núcleo das células F/R apresenta coloração por hematoxilina mais intensa, indicando uma cromatina mais condensada em contraste com a cromatina mais clara e menos condensada das células G. O citoplasma de ambos os tipos celulares apresenta inúmeros vacúolos de tamanhos variáveis, observáveis como regiões circulares não coradas com eosina.

Para analisar a provável composição lipídica das vesículas citoplasmáticas observadas, utilizamos a coloração específica para lipídeos: *Oil Red O*. Nas Figuras 17C-17F confirmamos que a maioria das células G e F/R apresentam vesículas citoplasmáticas de diferentes tamanhos coradas com o *Oil Red* e que são, portanto, vesículas de estoque lipídico. Aparentemente, as células F/R apresentam vesículas maiores e mais numerosas (Figuras 17D e 17F), entretanto, esta diferença pode ser devida à sua morfologia menos espalhada em comparação com as células G (Figuras 17C e 17E). As células NIH 3T3 Clone A31, uma linhagem de fibroblastos de camundongo, foi utilizada como controle negativo do experimento com *Oil Red* (Figuras 17G e 17H).

Figura 17: Fotomicrografias das culturas de células de suprarenal de rato coradas com hematoxilina e eosina (**A e B**) e *Oil Red O* (**C-H**). Células Glomerulosas (**A, C e E**), Fasciculadas/Reticuladas (**B, D e F**) e NIH 3T3 (**G e H**) após 48 h em DMEM + 10%SFB. Aumento de 400× (**A-D e G**) e 1000× (**E, F e H**).

Com a finalidade de caracterizarmos os tipos celulares obtidos após o processamento das glândulas e isolamento das culturas de células G e F/R, analisamos a expressão das enzimas citocromo P450 11 β -hidroxilase, altamente expressa pelas células F/R (Figura 18A), e tirosina hidroxilase (Figuras 18A e 18B) exclusiva de células adrenomedulares.

Podemos observar na Figura 18A que a expressão da enzima citocromo P450 11 β -hidroxilase é predominante no extrato protéico total de células F/R, enquanto o extrato das células G apresenta uma pequena expressão. Podemos observar, também, que há uma pequena expressão de tirosina hidroxilase no extrato protéico das células F/R, estando completamente ausente no extrato das células G.

Para quantificar o número de células adrenomedulares sobreviventes após 24 h de careciamento para soro em DMEM + 0,5% SFB na cultura de células F/R, nós realizamos a imunomarcção de preparações de células F/R com anticorpo específico para tirosina hidroxilase de rato (Figura 18B).

Na cultura de células F/R, células positivamente-marcadas para tirosina hidroxilase representam somente $2 \pm 1\%$ do total de células plaqueadas (Figura 18B a-b). As células da linhagem PC12 de feocromocitoma de rato, foram utilizadas como controle positivo para a marcação de tirosina hidroxilase (Figura 18B c-d).

A

B

Figura 18: Expressão das proteínas citocromo P450 11β-hidroxilase e tirosina hidroxilase nas células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticuladas (F/R) de suprarrenal de rato, através do método de *immunoblotting* (**A**) e nas células F/R e PC12 pelo método de imunoperoxidase (**B**). **B**: Fotomicrografias das células F/R (a e b); PC12 (c e d); controles negativos (b e d). Aumento de 400×.

4.2 O Efeito Biológico Promovido pelo ACTH, FGF2 e N-POMC

4.2.1 Análise da Proliferação e Viabilidade das Células G e F/R

As células de tumor de suprarrrenal de camundongo, a linhagem Y1, respondem a tratamentos de ACTH com um característico, mas reversível, arredondamento a partir de 15 minutos. Essa alteração morfológica foi descrita como facilitadora da sinalização cAMP/PKA, crítica para a mobilização do colesterol para a mitocôndria e consequente aumento da secreção de esteroides (Colonna e Podesta, 2005).

A partir das fotomicrografias apresentadas nas Figuras 19A e 19B, podemos observar que as células da cultura primária carenciadas em DMEM + 0,5% SFB (Controle) por 2 - 3 dias são similares morfológicamente às células em crescimento exponencial (10% SFB). Porém, as células da cultura primária submetidas a tratamentos sustentados de 1 e 100 nM de ACTH sofrem um arredondamento dose e tempo-dependente observável a partir de 24 h, recapitulando o efeito observado na linhagem tumoral que, no entanto, é mais lento.

A

Figura 19: Fotomicrografias de contraste de fase dos efeitos dose e tempo-dependente do ACTH nas células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticuladas (F/R) de suprarrenal de rato. As células da cultura primária carenciadas para soro em DMEM + 0,5%SFB foram submetidas a tratamentos de 1 e 100 nM de ACTH e 10%SFB ou não tratadas (Controle) por 48 h (**A**) e 72 h (**B**). Aumento de 200×.

Existem diferenças significativas na resposta proliferativa entre as células da linhagem tumoral de camundongo Y1 e as células da cultura primária de suprarenal de rato (Mattos e Lotfi, 2005). Enquanto tratamentos em pulso de ACTH induzem a progressão da fase G1 para S do ciclo celular nas células Y1 (Lotfi et al., 1997), nas células da cultura primária o ACTH apresenta um efeito antimitogênico apesar da fosforilação de CREB e aumento da expressão de c-Fos.

Utilizando o ensaio de exclusão com o corante vital azul de tripan, foi observado que as células G com 0,5% de SFB continuam a proliferar, quando comparadas com as células F/R, que mantêm um número estável de células nas mesmas condições. Mesmo com uma diminuição significativa dos fatores de crescimento, devido a baixa concentração de soro, as células G duplicaram seu número de células durante os três dias em cultura (Figuras 20A e 20B).

Em Mattos e Lotfi (2005) descrevemos, através de ensaios de incorporação de bromodioxiuridina (BrdU), que estímulos de 2 h ou 24 h de ACTH apresentam um efeito antiproliferativo nas células das culturas primárias. Nesse trabalho mostramos através de dois ensaios de citotoxicidade, ensaio por exclusão com o corante vital azul de tripan e ensaio metabólico por MTS, que tratamentos sustentados de três dias com ACTH produzem um efeito citotóxico tempo-dependente em ambos os tipos celulares (Figuras 20A-F). Ambos os ensaios indicaram que 1 nM de ACTH induz uma diminuição significativa da viabilidade celular, para as células G com início em 24 h (Figuras 20A, 20C e 20E) e nas células F/R com 60 h (Figuras 20B e 20F). Vale ressaltar que, após 72 h de carenciamento em 0,5% de soro, ambos os tipos celulares não apresentam diminuição significativa da viabilidade e como o esperado, as culturas mantidas com 10% de soro apresentam níveis de viabilidade maiores em relação às células carenciadas (Figuras 20E e 20F).

Figura 20: Ensaios de viabilidade e proliferação por exclusão com corante vital azul de tripan (**A-D**) e ensaio de MTS (**E e F**). Células Glomerulosas (**A, C e E**) e Fasciculadas/Reticuladas (**B, D e F**) de suprarenal de rato. **A-D:** As células carenciadas para soro (DMEM + 0,5%SFB) foram tratadas com 1 nM ACTH por 24, 48 e 72 h (**A e B**) ou 0,001, 0,1 e 1 nM ACTH por 24 h (**C e D**) ou não tratadas (Controle). Os resultados representam número médio de células viáveis $\pm$ desvio padrão ($n=3$). **E e F:** As células carenciadas em DMEM + 0,5%SFB foram tratadas com 0,001 e 1 nM ACTH, 10%SFB ou não tratadas (Controle) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média da densidade óptica $\pm$ desvio padrão ($n=5$). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ (tratado vs. controle).

Com o intuito de testar a resposta mitogênica das células G e F/R utilizamos o FGF2, um conhecido fator mitogênico nas suprarrenais (Gospodarowicz, 1975). Como apresentado nas Figuras 21A e 21B, as células G e F/R foram tratadas por três dias de maneira sustentada com diferentes concentrações de FGF2 e analisadas através do ensaio de MTS. O efeito do FGF2 foi comparado ao do soro fetal bovino. Os resultados mostraram um efeito proliferativo do FGF2, em ambos os tipos celulares, comparável ao efeito promovido por 10% de soro. Além disso, esse efeito é tempo-dependente com exceção nas células G com 0,05 nM em 24 h (Figura 21A).

Figura 21: Ensaios de viabilidade e proliferação por MTS em células Glomerulosas (A) e Fasciculadas/Reticuladas (B) de suprarrenal de rato tratadas com FGF2. As células da cultura primária carenciadas para soro em DMEM + 0,5%SFB foram tratadas com 0,05 ou 0,5 nM de FGF2, 10%SFB ou não tratadas (Controle) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média da densidade óptica $\pm$ desvio padrão (n=3). Análise estatística ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ (tratado vs. controle do respectivo dia).

A análise do efeito citotóxico e proliferativo de diferentes concentrações dos peptídeos sintéticos N-POMC₁₋₂₈ de rato com (N-POMC^w) e sem pontes dissulfeto (N-POMC^{w/o}) em tratamentos sustentados mostrou que 1 nM e 100 nM de N-POMC^w induzem eficientemente a proliferação em ambos os tipos celulares (Figuras 22A e 22B). Entretanto, 10 µM de N-POMC^w e N-POMC^{w/o} induzem proliferação das células G somente em 24 h (Figura 22A). Além disso, somente a concentração de 10 µM de N-POMC^{w/o} promoveu uma proliferação significativa nas células F/R (Figura 22B).

Figura 22: Ensaios de viabilidade e proliferação por MTS em células Glomerulosas (**A**) e Fasciculadas/Reticuladas (**B**) de suprarenal de rato tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos sintéticos N-POMC₁₋₂₈. As células da cultura primária carenciadas para soro em DMEM + 0,5%SFB foram tratadas com 1 nM, 100 nM ou 10 µM N-POMC₁₋₂₈ com pontes (N-POMC^w) ou sem pontes (N-POMC^{w/o}) e 10%SFB ou não tratadas (Controle) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média da densidade óptica ± desvio padrão (n=3). Análise estatística ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001 (tratado vs. controle do respectivo dia).

4.2.2 Análise da Senescência nas Células G e F/R tratadas com ACTH

Devido às observações de citotoxicidade e redução da proliferação nas células da cultura primária de suprarenal de rato tratadas com ACTH, analisamos esses efeitos através de ensaios de senescência, autofagia e morte celular como indicado nas Figuras 23 a 26 e Tabela 2. Para testar a indução de senescência utilizamos a coloração SA- β -Gal (Figura 23). De uma forma geral, independente das condições as quais as células foram submetidas, menos de 20% das células G (Figura 23A) e por volta de 10% das células F/R (Figura 23B), apresentam evidências morfológicas e de coloração que foram interpretadas como senescência.

O carenciamento para 0,5% SFB aumentou o número de células G e F/R senescentes em função do tempo, o mesmo ocorrendo com as células F/R mantidas em 10% SFB. Por outro lado, nossa análise mostra que após 72 h de tratamento com ACTH há uma diminuição do número de células G e F/R em senescência, independente da dose utilizada.

Como a senescência leva as células a estacionarem na fase G1 do ciclo celular (Pignolo et al., 1998) e a ficarem em um estado refratário a qualquer tipo de estímulo, analisamos a distribuição das células das culturas tratadas com ACTH nas fases do ciclo celular e marcadas com iodeto de propídeo por citometria de fluxo. A maneira como esse fenômeno é detectado é através do acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular. Nas Figuras 24A e 24B observamos que ambos os tratamentos com ACTH, de forma tempo-dependente, fazem com que as células exibam uma migração para uma região do gráfico denominada de sub-G1 (M1) que indica fragmentação do DNA e portanto algum tipo de morte celular. Portanto, não houve o acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular o que caracterizaria células em senescência.

Figura 23: Ensaio de senescência através de coloração por SA- β -Gal em células Glomerulosas (**A**) e Fasciculadas/Reticuladas (**B**) tratadas com diferentes tempos e concentrações de ACTH. As células foram tratadas com 1 ou 100 nM ACTH, 10%SFB ou não tratadas (Controle) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média da porcentagem de células marcadas $\pm$ desvio padrão (n=3). Análise estatística ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 (tratamentos vs. controle do respectivo dia); ###P<0,001 (controle vs.10%SFB do respectivo dia).

A **B**

Figura 24: Experimento representativo dos efeitos do ACTH no ciclo celular das células Glomerulosas (**A**) e Fasciculadas/Reticuladas (**B**) de suprarenal de rato. As células da cultura primária carenciadas para soro em DMEM + 0,5%SFB foram tratadas com 1 ou 100 nM ACTH, 10%SFB ou não tratadas (Controle) por 24, 48 e 72 h. As células foram coradas com iodeto de propídeo e analisadas em citômetro de fluxo no filtro FL2-H. **M1**: Sub-G1, células com conteúdo de DNA inferior a 2n; **M2**: Fases G0-G1, células com conteúdo de DNA igual a 2n; **M3**: Fase S, células em processo de duplicação do conteúdo de DNA; **M4**: Fases G2-M, células com o dobro do conteúdo de DNA.

4.2.3 Análise da Autofagia nas Células G e F/R tratadas com ACTH

Na Figura 25 observamos que as células da cultura primária apresentam um nível basal de expressão de LC3B-II. Além disso, o tratamento com ACTH 1 nM é capaz de induzir um aumento da forma ativa da proteína autofágica LC3B nas células G após 24 h, este aumento no entanto é inferior ao observado no tratamento controle-positivo com o meio Krebs-Ringer. As células F/R, ao contrário, não apresentaram alteração significativa dos níveis desta proteína com nenhum dos tratamentos.

Figura 25: *Immunoblotting* representativo da expressão da proteína LC3B-II (14 KDa) nas células Glomerulosas (**A**) e Fasciculadas/Reticuladas (**B**) de suprarrenal de rato estimuladas com 1 nM ACTH (A), meio Krebs-Ringer (KR), 10%SFB (10%) ou não tratadas (0,5% = controle) por 4 e 24 h (n=2).

4.2.4 Análise da Morte Celular nas Células G e F/R tratadas com ACTH

Os resultados da análise da morte celular (Tabela 2 e Figura 26) mostram que o ACTH induziu apoptose precoce e tardia, em ambos os tipos celulares, de forma dose e tempo-dependente, detectáveis pela marcação simples com anexina V-FITC e pela dupla-marcação com anexina V-FITC+iodeto de propídeo, respectivamente. Entretanto, o número de células necróticas permaneceu constante, nunca excedendo $5 \pm 3\%$ (média $\pm$ desvio padrão, $n = 4$) em qualquer tratamento, em ambos os tipos celulares.

Corroborando os resultados de citotoxicidade e proliferação, as células F/R apresentam resistência aos efeitos pró-apoptóticos do ACTH. A partir dos dados da Tabela 2, evidenciamos que as células F/R só demonstram aumento significativo de apoptose no terceiro dia de tratamento sustentado, independentemente da dose utilizada.

Tabela 2 - Efeito pró-apoptótico do ACTH nas culturas primárias de células adrenocorticais de rato.

Células	Tratamentos	Apoptose (%)		
		24 h	48 h	72 h
G	Controle	$21,0 \pm 8,5$	$20,8 \pm 5,7$	$24,7 \pm 7,8$
	ACTH 1 nM	$61,5 \pm 7,0^{***}$	$80,9 \pm 7,4^{***}$	$81,1 \pm 9,7^{***}$
	ACTH 100 nM	$62,2 \pm 8,5^*$	$78,1 \pm 20,7^{**}$	$63,9 \pm 20,9^*$
F/R	Controle	$21,1 \pm 7,3$	$40,2 \pm 13,6$	$29,2 \pm 5,1$
	ACTH 1 nM	$44,0 \pm 11,5^*$	$59,4 \pm 5,3$	$68,3 \pm 12,8^{***}$
	ACTH 100 nM	$44,9 \pm 15,8$	$66,3 \pm 9,0$	$66,5 \pm 21,0^*$

Média $\pm$ Desvio Padrão

G = células Glomerulosas; F/R = células Fasciculadas/Reticuladas

Controle = células em DMEM + 0,5% SFB sem tratamentos

Análise estatística ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer ($n = 4$):

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (tratamento vs. controle)

Figura 26: Ensaio de citometria de fluxo para análise da morte celular em células Glomerulosas (**G**) e Fasciculadas/Reticuladas (**F/R**) de suprarenal de rato tratadas com 1 ou 100 nM de ACTH, 10%SFB ou não-tratadas (Controle) por 72 h. Os níveis de viabilidade, necrose e apoptose foram quantificados após dupla-marcação com anexina V-FITC (FL1-H) e iodeto de propídeo (FL3-H). Células não-marcadas (quadrantes inferior esquerdo) = células viáveis; células marcadas somente com iodeto de propídeo (quadrantes superior esquerdo) = necrose; células marcadas somente com anexina (quadrante inferior direito) = apoptose precoce; células duplamente marcadas (quadrante superior direito) = apoptose tardia. Os valores dentro dos quadrantes indicam a porcentagem (%) de células em cada condição neste experimento representativo. Veja Tabela 2 para médias e desvio padrão de 4 experimentos independentes.

4.3 Análise das Vias de Sinalização ativadas pelo ACTH, FGF2 e N-POMC nas Culturas Primárias da Suprarrenal de Rato

4.3.1 As vias MAPKs: ERK1/2, JNK e p38

Como apresentado na Figura 27A, o ACTH não estimula a via ERK1/2 após 15 min de tratamento, enquanto FGF2 é um forte ativador desta via em ambos os tipos celulares, e com intensidade semelhante à indução promovida por 10% de SFB. Tratamentos conjuntos de ACTH e FGF2 mostram que o ACTH interfere negativamente na fosforilação promovida pelo FGF2.

A via JNK é inibida pelo ACTH enquanto o FGF2 fosforila essa via em ambos os tipos celulares (Figura 27B), à semelhança da ativação com 10% de SFB. A inibição promovida pelo ACTH fica mais evidente em tratamentos conjuntos de ACTH e FGF2.

Na Figura 27C, observamos que somente o FGF2 fosforila a via p38 nas células G enquanto as células F/R não apresentam ativação dessa via em nenhum dos tratamentos utilizados.

Na concentração de 10 μ M, ambos os peptídeos N-POMC₁₋₂₈, com (N-POMC^w) e sem pontes dissulfeto (N-POMC^{w/o}) foram capazes de estimular a fosforilação de ERK nas células G e F/R (Figura 28), com diferentes cinéticas. Enquanto a fosforilação de ERK estimulada com N-POMC^w ocorre em 5 min, com N-POMC^{w/o} a fosforilação de ERK ocorre após 15 min de tratamento.

Tratamentos de 15 min com 10 μ M N-POMC^{w/o} fosforila p38 nas células F/R (Figura 29A). JNK não foi ativada de forma significativa com nenhuma das concentrações em nenhum dos tipos celulares (Figura 29B).

Figura 27: *Immunoblotting* representativo e densitometria da fosforilação de ERK (A), JNK (B) e p38 (C) nas células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticuladas (F/R) tratadas por 15 min com 1 nM ACTH (A), 0,5 nM de FGF2 (F), tratamentos conjuntos de 1 nM ACTH + 0,5 nM FGF2 (A+F), 10% SFB (10%) ou não tratadas (Controle). A análise quantitativa da fosforilação das proteínas está apresentada em porcentagem em relação ao controle (células controles não-tratadas = 100%) $\pm$ desvio padrão. ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (tratamentos vs. controle); # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ (A+F vs. FGF) (n=3).

Figura 28: *Immunoblotting* representativo e densitometria da fosforilação de ERK nas células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticuladas (F/R). Células carenciadas para soro em DMEM + 0,5% SFB não foram tratadas (Controle = C) ou foram tratadas **A:** por 15 min com 10 μM, 100 nM, 1 nM, 0,01 nM de N-POMC₁₋₂₈ sem pontes ou 1 nM ACTH (A); **B:** por 15 min com 10 μM (10), 100 nM (100), 1 nM (1) de N-POMC₁₋₂₈ com pontes, 1 nM ACTH (A) ou 0,5 nM FGF2 (F); **C:** com 10 μM de N-POMC₁₋₂₈ com pontes por 5, 10, 15 e 30 min ou 1 nM ACTH (A) e 0,5 nM FGF2 (F) por 15 min. A análise quantitativa da fosforilação de ERK está indicada como porcentagem em relação ao controle (células controles não-tratadas = 100%) ± desvio padrão. ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (tratamentos vs. controle) (n=3).

Figura 29: *Immunoblotting* representativo e densitometria da fosforilação de p38 (**A**) e JNK (**B**) nas células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticuladas (F/R) tratadas com 1 nM, 100 nM ou 10 μM de N-POMC₁₋₂₈ sem pontes (N-POMC^{w/o}) por 15 min ou não tratadas (Controle = DMEM+0,5%SFB). A análise quantitativa da fosforilação dessas proteínas está indicada como porcentagem em relação ao controle (células controles não-tratadas = 100%) ± desvio padrão. ANOVA com pós-teste de Tukey: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (tratamentos vs. controle) (n=4).

4.3.2 As vias PKA e PKB (Akt)

Na Figura 30A mostramos que tanto o ACTH como o FGF2 são capazes de ativar CREB nas células da cultura primária. A fosforilação de CREB promovida por tratamentos conjuntos de ACTH + FGF2 é comparável a ação isolada do ACTH.

As células G e F/R respondem de maneira distinta à ativação de PKB/Akt, enquanto as células G mostram uma fosforilação sustentada de Akt entre 15 - 30 min após tratamento com ACTH e entre 5 - 30 min após tratamento com FGF2, as células F/R, independente do tratamento aplicado, apresentam um pico de fosforilação de Akt em 5 min (Figuras 30C e 30D). Os tratamentos conjuntos de ACTH + FGF2, em 15 min, são mais eficientes na fosforilação de Akt do que cada um dos tratamentos isolados (Figura 30B).

Tratamentos de 15 min com 1 nM N-POMC^{w/o} estimulam a fosforilação de Akt nas células G (Figura 30E), enquanto 10 μM N-POMC^{w/o} fosforila CREB nas células F/R (Figura 30F).

Figura 30: *Immunoblotting* representativo e densitometria da fosforilação de CREB (**A** e **F**) e Akt (**B-E**) nas células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticuladas (F/R). **A** e **B**: tratadas com 1 nM ACTH (A), 0,5 nM de FGF2 (F), tratamentos conjuntos de 1 nM ACTH + 0,5 nM FGF2 (A+F), 10% SFB (10%) ou não tratadas (Controle) por 15 min. Tratadas por 5, 15 ou 30 min com 1 nM ACTH A5, A15 e A30 (**C**); ou 0,5 nM de FGF2 F5, F15 e F30 (**D**). Tratadas com 1 nM, 100 nM ou 10 μ M de N-POMC₁₋₂₈ sem pontes (N-POMC^{w/o}) por 15 min (**E** e **F**). A análise quantitativa da fosforilação dessas proteínas está indicada como porcentagem em relação ao controle (células controles não-tratadas = 100%) $\pm$ desvio padrão. ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (tratamentos vs. controle); # $P < 0,05$ (A+F vs. FGF) ($n=4$).

4.4 A Inibição das Vias de Sinalização nas Culturas Primárias de Suprarrenal de Rato

4.4.1 A Utilização de Inibidores Farmacológicos

Primeiramente, foram testadas as concentrações de inibidores a serem utilizadas segundo dados da literatura (Forti et al., 2002; Schwindt et al., 2003; Otis et al., 2005), na eficiência de inibição através da análise de experimentos de *immunoblotting* e na citotoxicidade através de ensaios de MTS. Dessa forma foram determinadas as seguintes concentrações: 10 μ M de U0126, 10 μ M de SP600125, 5 μ M de SB203580, 1 μ M de H89, 0,5 μ M de bisindolilmaleimida e 1 μ M de Wortmanina (Figuras 31 e 32).

A

B

C

D

E

Figure 31: Ensaios de *immunoblotting* para a determinação das concentrações dos inibidores das vias de sinalização nas células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticuladas (F/R). Células da cultura primária carenciadas para soro em DMEM + 0,5%SFB foram pré-tratadas por 30 min com **A:** inibidor de MEK/ERK 10 μ M de U0126; **B:** inibidor de JNK 10 μ M de SP600125; **C:** inibidor de p38 5 μ M de SB203580; **D:** inibidor de PKA 1 μ M de H-89 e inibidor de PKC 0,5 μ M de bisindolilmaleimida; 0,1% de DMSO **E:** inibidor de PI3K/Akt 1 μ M de Wortmanina; e então tratadas com 0,5 nM FGF2 ou 1 μ M Anisomicina por 15 min.

Figura 32: Ensaio de MTS utilizando diferentes inibidores das vias de sinalização nas células Glomerulosas (**A, C, E, G e I**) e Fasciculadas/Reticuladas (**B, D, F, H e J**). Tratamentos com 10%SFB, 0,1% DMSO ou **A-B:** inibidor de MEK/ERK 10 μ M U0126; **C-D:** inibidor de JNK 10 μ M SP600125; **E-F:** inibidor de p38 5 μ M SB203580; **G-H:** inibidor de PI3K/Akt 1 μ M Wortmanina; **I-J:** inibidor de PKA 1 μ M H89 e inibidor de PKC 0,5 μ M bisindolilmaleimida por 24, 48 e/ou 72 h. Os resultados são expressos como média da densidade óptica $\pm$ desvio padrão (n=3). Análise estatística ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ (tratado vs. controle do respectivo dia).

O efeito proliferativo desencadeado pelo FGF2 foi diminuído com a utilização do inibidor da via ERK (Figuras 33A e 33B) e totalmente abolido com a inibição de JNK (Figuras 34A e 34B) em ambos os tipos celulares.

O efeito proliferativo desencadeado pelos peptídeos N-POMC₁₋₂₈ com e sem pontes foi completamente abolido com a utilização do inibidor de ERK (Figuras 33C-F). O peptídeo N-POMC₁₋₂₈ sem pontes teve seu efeito proliferativo abolido em ambos os tipos celulares com a inibição de JNK (Figuras 34A e 34B) e somente nas células G com a inibição de p38 (Figuras 34C e 34D) e PI3K/Akt (Figuras 34E e 34F).

O efeito citotóxico desencadeado pelo ACTH não sofreu interferência com a utilização dos inibidores de PKA e PKC isoladamente ou em conjunto (Figuras 33G e 33H). Porém, o mesmo efeito foi significativamente revertido com a utilização do inibidor da via p38 (Figuras 34C e 34D) em ambos os tipos celulares.

Figura 33: Ensaio de citotoxicidade por MTS utilizando inibidores específicos das vias de sinalização ERK, PKA e PKC nas células Glomerulosas (A, C, E e G) e

Fasciculadas/Reticuladas (**B**, **D**, **F** e **H**) tratadas com FGF2, N-POMC₁₋₂₈ com e sem pontes e ACTH. As células carenciadas para soro em DMEM + 0,5%SFB foram pré-tratadas por 30 min com o inibidor de ERK 10 μ M de U0126 (**A-F**) ou inibidores de PKA 1 μ M H89 e PKC 0,5 μ M bisindolilmaleimida (Bis), e então não-estimuladas (Controle) ou estimuladas com 0,5 nM FGF2 (**A-B**), 100 nM or 10 μ M N-POMC₁₋₂₈ (**C-F**) ou 1 nM ACTH (**G-H**) por 24, 48 e/ou 72 h como indicado. Os resultados são expressos como média da densidade óptica $\pm$ desvio padrão. Análise estatística ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ (tratado vs. controle do respectivo dia); # $P<0,05$; ## $P<0,01$; ### $P<0,001$ (inibidor+tratamento vs. tratamento do respectivo dia) (n=3).

A **B**

C

D

Figura 34: Ensaio de citotoxicidade por MTS utilizando inibidores específicos das vias de sinalização JNK, p38 e PI3K/Akt nas células Glomerulosas (**A**, **C** e **E**) e Fasciculadas/Reticuladas (**B**, **D** e **F**) tratadas com FGF2, N-POMC₁₋₂₈ sem pontes e ACTH. As células carenciadas para soro em DMEM + 0,5%SFB foram pré-tratadas por 30 min com **A-B**: inibidor de JNK 10 μ M SP600125 (SP); **C-D**: inibidor de p38 5 μ M SB203580 (SB); **E-F**: inibidor de PI3K/Akt 1 μ M Wortmanina (Wort). As células foram então submetidas a 1 nM ACTH (ACTH ou A), 0,5 nM FGF2 (FGF ou F), 10 μ M de N-POMC₁₋₂₈ sem pontes (POMC ou P) e tratamentos combinados (A+F ou A+P) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média da densidade óptica $\pm$ desvio padrão. Análise estatística ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (tratado vs. controle do respectivo dia); # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ (inibidor+tratamento vs. tratamento do respectivo dia) ($n=3$).

4.4.2 A Utilização da Interferência de RNA para Inibição de ERK e CREB

Os resultados utilizando os inibidores farmacológicos indicaram que o efeito apoptótico do ACTH é independente das vias PKA e PKC, mas que por outro lado os efeitos proliferativos do FGF2, N-POMC^w e N-POMC^{w/o} são dependentes de MEK/ERK. Com a intenção de corroborarmos esses resultados, com uma abordagem mais específica para a inibição das vias de sinalização, utilizamos a interferência de RNA para o silenciamento pontual de CREB e das duas isoformas de ERK (p42 e p44).

Primeiramente foi analisada a eficiência de transfecção das células da cultura primária através da utilização de 100 nM de siRNA para GAPDH marcado com Cy³. A eficiência de transfecção foi de aproximadamente 70%: $72,42 \pm 8,44\%$ para as células Glomerulosas e $69,57 \pm 3,47\%$ para as células Fasciculadas/Reticuladas (n=5).

Os resultados da análise da expressão de CREB mostram que essa proteína foi eficientemente silenciada (Figura 35A), no entanto tal diminuição não foi suficiente para a reversão do efeito antiproliferativo do ACTH (Figuras 36A e 36B).

Na Figura 35B observamos a diminuição da expressão das isoformas p42 e p44 de ERK, esta diminuição é mais evidente com a utilização combinada dos siRNAs e particularmente nas células F/R. Curiosamente, a isoforma P-p42 de ERK não sofreu alteração no seu nível de fosforilação com a utilização de siRNAs específicos, enquanto a isoforma P-p44 apresentou uma significativa diminuição de fosforilação em ambos os tipos celulares. Apesar da manutenção dos níveis de fosforilação de P-p42, o silenciamento obtido foi suficiente para inibir o efeito proliferativo de FGF2 (Figuras 36C e 36D). Nas células G, somente o silenciamento combinado de p42 e p44 foi capaz de abolir o efeito proliferativo do FGF2. No entanto, de maneira inesperada o silenciamento de apenas uma das isoformas de ERK, p42 ou p44, levou a um aumento significativo na proliferação celular (Figura 36C). Nas células F/R, o silenciamento de uma ou de ambas as isoformas de ERK impediu completamente o efeito proliferativo do FGF2 (Figura 36D).

A **B**

Figura 35: *Immunoblotting* representativo das proteínas CREB e ERK e sua fosforilação em células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticuladas (F/R) transfectadas com RNA de interferência. Células da cultura primária carentes para soro foram transfectadas com **A**: 50 ou 100 nM de siRNA Controle Negativo (Negativo), siRNA para CREB ou somente agente de transfecção (Amina) e então foram desafiadas por 15 min com 1 nM ACTH; **B**: 100 nM de siRNA para as isoformas p42 e p44 de ERK e então desafiadas por 15 min com 0,5 nM de FGF2 (n=3-5).

A

B

C

D

Figura 36: Ensaios de viabilidade e proliferação por MTS, efeito do ACTH e do FGF2 na viabilidade das células adrenocorticais de rato silenciadas para CREB ou ERK. Células da cultura primária carenciadas para soro Glomerulosas (A e C) e Fasciculadas/Reticuladas (B e D) foram transfectadas com siRNA para CREB (A e B), siRNA para ERK (C e D), siRNA Controle Negativo (Negativo) ou somente o agente de transfecção (Amina) e então desafiadas com 1 nM ACTH (A) ou 0,5 nM FGF2 (F) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média da densidade óptica $\pm$ desvio padrão. Análise estatística ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (tratado vs. controle do respectivo dia); # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ (siRNA+tratamento vs. tratamento do respectivo dia) ($n=3$).

Após sete dias em cultura, não foi possível observar o efeito proliferativo dos peptídeos N-POMC com e sem pontes, nem mesmo nas células não-transfectadas (Figuras 37A e 37B).

A

B

Figura 37: Ensaios de viabilidade e proliferação por MTS, efeito dos peptídeos N-POMC₁₋₂₈ com e sem pontes na viabilidade das células adrenocorticais de rato. Células da cultura primária que permaneceram em cultura por sete dias, células Glomerulosas (**A**) e Fasciculadas/Reticuladas (**B**) foram expostas a 10%SFB, 100 nM N-POMC₁₋₂₈ com pontes (NPOMC^w) ou 10 µM de N-POMC₁₋₂₈ sem pontes (NPOMC^{w/o}) por 24, 48 e 72 h. Os resultados são expressos como média da densidade óptica $\pm$ desvio padrão. Análise estatística ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (tratado vs. controle do respectivo dia) (n=3).

5 DISCUSSÃO

5.1 A Caracterização da Cultura Primária

As culturas primárias de células adrenocorticais de rato têm se mostrado um sistema biológico útil para o estudo dos mecanismos que controlam aspectos da fisiologia celular da glândula adrenal. A preparação e caracterização das células obtidas, células da Glomerulosa, células G, e células da Fasciculada e Reticulada, células F/R, tem se mostrado uma importante ferramenta para a análise dos efeitos de fatores de crescimento peptídicos como o FGF2, os peptídeos N-terminal da POMC e o ACTH em células adrenais normais. O protocolo utilizado para a separação dos diferentes tipos celulares na cultura primária de suprarenal de rato está de acordo com o descrito previamente por Gallo-Payet et al. (1990). Além disso, nossos resultados de obtenção e caracterização das culturas são similares com aqueles descritos na literatura (Otis et al., 2005, 2007).

Através da utilização de diferentes abordagens, algumas previamente descritas em Mattos e Lotfi (2005), comprovamos a eficiência de separação dos tipos celulares, células G e células F/R, com uma pequena contaminação de cerca de 2% de células da medula adrenal nas culturas de células F/R, que quando carenciadas para soro, não sobrevivem às condições do meio utilizado. Além disso, a preparação de células G apresenta cerca de 0,1% de células com morfologia fibroblastoide (Mattos e Lotfi, 2005) que provavelmente têm origem na cápsula conjuntiva e nas células subcapsulares, às quais existem evidências de serem células progenitoras do córtex adrenal (Wood e Hammer, 2011). Outras características observadas foram com relação à capacidade de espraio no substrato e na condensação da cromatina. As células G são maiores, apresentam um rápido espraio e cromatina pouco condensada, em contraste as células F/R são menores, permanecem em pequenos grupos e apresentam a cromatina mais condensada. A análise das estruturas vacuolares observadas no citoplasma, longe de serem vesículas de lisossomos, mostrou que estas estão relacionadas ao estoque lipídico, característico de células produtoras de esteroides.

A análise das culturas sob um aspecto funcional mostrou uma baixa expressão da enzima P450 11 β -hidroxilase nas células G, o que confirma resultados anteriores que mostram uma diferença de quatro vezes na expressão do RNAm

desta enzima entre as zonas Glomerulosa e Fasciculada de ratos não tratados (Oertle e Muller, 1993). Evidências da expressão exclusiva da enzima P450 aldosterona sintase pelas células da zona Glomerulosa foram publicadas previamente em Mattos e Lotfi (2005).

5.2 O Efeito Biológico

A análise dos resultados observados do efeito biológico após carenciamento para soro por três dias, que mostram o potencial proliferativo das células G, estão de acordo com o discutido por Vinson (2003). Nesse trabalho foi evidenciado que existem diferenças importantes na resposta mitogênica e funcional entre as células do córtex, destacando que a zona Fasciculada é a principal produtora de esteroide enquanto a zona Glomerulosa é o local de proliferação e diferenciação. Nossos resultados sugerem que os tipos celulares que compõem a região mais externa da glândula (células Glomerulosas, subcapsulares e capsulares) podem estar representados na cultura de células G e podem ser os responsáveis pelo seu potencial proliferativo.

Os tratamentos com ACTH por três dias nas culturas primárias de células de suprarenal de rato induzem a diminuição da atividade metabólica e inibição da proliferação, levando à morte por apoptose. Esses resultados ampliam os resultados já publicados (Lotfi et al., 1997; Mattos e Lotfi, 2005) onde o uso da linhagem Y1 e das culturas primárias de rato tratadas por 24 h com ACTH apresentam um efeito antimitogênico. Esses resultados estão de acordo com vários trabalhos da literatura (Gospodarowicz e Handley, 1975; Ramachandran e Suyama, 1975; Hornsby e Gill, 1977; Simonian e Gill, 1981) que utilizaram culturas primárias de suprarenal murinas, bovinas e humanas.

Em contraste com os trabalhos acima descritos estão os resultados de Armato et al. (1975), que observaram que tratamentos com ACTH em culturas primárias de suprarenal humana levaram ao aumento na síntese de DNA e do número de células na fase S e M do ciclo celular, resultando em proliferação.

Os resultados da diminuição da proliferação induzida pelos tratamentos com ACTH não se deve a entrada das células da cultura primária em senescência. A

senescência celular contribui para processos fisiológicos de envelhecimento normal do organismo, pois há dados que mostram um acúmulo de células senescentes *in vivo* com o avanço da idade (Jeyapalan e Sedivy, 2008). Conceitualmente há duas categorias de **senescência celular**. A primeira, **senescência replicativa**, é iniciada pelo encurtamento dos telômeros, ou outras formas de estresse genotóxico gerando respostas ao dano no DNA mediadas principalmente por p53 (d'adda di Fagagna et al., 2004; Herbig et al., 2004). A segunda resposta, **senescência prematura**, muito menos compreendida, é caracterizada pelo aumento da expressão do inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKI p16^{INK4a}) em resposta a uma variedade de estresses (oxidativo, por exemplo), condições patológicas, ativação de oncogenes, mudança no microambiente, fatores nutricionais, desenvolvimento e sinais endócrinos. Nossos resultados sobre a análise da senescência das culturas primárias sugerem que as células da cultura primária de suprarenal apresentam uma pequena porcentagem de células senescentes, senescência do tipo prematura, provavelmente devido ao estresse promovido pela manipulação durante a preparação da cultura primária. No entanto, somado a esse tipo de senescência, podemos sugerir que adrenais de ratos adultos (50 - 60 dias) possam apresentar certo número de células senescentes, senescência do tipo replicativa, compondo a fisiologia normal desses animais como descrito por Herbig e Sedivy (2006) e Jeyapalan et al. (2007).

A autofagia é um fenômeno celular que envolve a degradação de proteínas e organelas, e provavelmente representa uma adaptação inata à escassez de nutrientes. Em períodos de deficiência de nutrientes, a célula pode se autodigerir e reciclar alguns componentes não-essenciais através de autofagia não-seletiva, mantendo níveis mínimos de crescimento até que a fonte de nutrientes se restabeleça (Van Limbergen et al., 2009). O meio Krebs-Ringer, um tampão fosfato acrescido de glicose, foi utilizado como controle positivo de indução de autofagia, uma vez que a privação de nutrientes por mais de 4 h induz autofagia em células eucarióticas através da inibição de TOR (*target of rapamycin* = alvo de rapamicina), uma proteína quinase altamente conservada evolutivamente (Jung et al., 2010). Assim como descrito por He e Klionsky (2009) observou-se que sob condições normais de soro há um nível baixo de autofagia-basal. Entretanto, podemos

observar indução de autofagia nas células G após 24 h de tratamento com ACTH e meio Krebs-Ringer. A análise da proteína LC3B por períodos mais longos de tratamento com ACTH e solução Krebs-Ringer (48 e 72 h) mostrou-se inviável, uma vez que as proteínas de controle interno das condições experimentais, proteínas β -actina e GAPDH, sofreram drásticas diminuições conforme aumentou-se o tempo dos tratamentos. No entanto, as células mantidas em 0,5% e 10% de SFB não apresentaram alteração da expressão das proteínas controle nem aumento de LC3B durante os três dias de experimento (resultados não mostrados). Em contraste com os resultados *in vitro*, injeções diárias de ACTH em ratos Sprague-Dawley reduzem em dez vezes o volume de vacúolos autofágicos citoplasmáticos, além de aumentar a hipertrofia e hiperplasia celular (Muller et al., 1987).

A diminuição da viabilidade celular induzida por ACTH foi acompanhada por um significativo aumento de morte celular via apoptose, mas não necrose, em ambos os tipos celulares. Além disso, os resultados de análise da proliferação, viabilidade e apoptose sustentam a ideia de que as células F/R são mais resistentes aos efeitos citotóxicos do ACTH do que as células G. Otis et al. (2005) observaram que células G tratadas por três dias com 5 nM Angiotensina II, à exemplo do que ocorre com tratamentos com ACTH, apresentam inibição da proliferação, no entanto apresentam um número baixo e não variável de células em apoptose. Carsia et al. (1997) demonstraram que em culturas de órgãos sem tratamentos, o aparecimento de apoptose é relativamente rápido e extenso nas zonas Fasciculada e Reticulada e aumenta com o período de incubação. Porém, a adição de ACTH ao meio atenua (em 59%), mas não impede, a apoptose neste modelo experimental. *In vivo*, a apoptose em adrenal de rato induzida por hipofisectomia é lenta e restrita a uma subpopulação de células da zona Reticulada (Carsia et al., 1996). Resultados do nosso laboratório mostraram que, em animais hipofisectomizados, tratamentos com ACTH exercem um efeito protetor contra a apoptose induzida pela hipofisectomia em todas as zonas do córtex (Torres et al., 2010).

O paradigma entre os efeitos do ACTH *in vitro* e *in vivo* sugere o envolvimento das inervações intraglandulares autônomas e do papel da integridade estrutural da glândula ou sua compartimentalização (Shepherd e Holzwarth, 2001). No entanto, trabalhos mais recentes (Otis et al., 2007) mostraram que diferentes componentes

de matriz extracelular (colágeno I e IV, fibronectina ou laminina) podem reproduzir, *in vitro*, a resposta proliferativa observada *in vivo*. As superfícies de colágeno IV e fibronectina, associadas ao tratamento com ACTH, aumentaram o número de células G positivas para BrdU, portanto em fase S do ciclo celular, enquanto nas células F/R somente o colágeno IV apresentou aumento estatisticamente significativo de núcleos marcados.

O FGF2 é considerado um fator mitogênico em vários sistemas adrenais *in vitro*, como células tumorais humanas e de camundongo, respectivamente, células NCI-H295 (Boulle et al., 2000) e Y1 (Gospodarowicz e Handley, 1975; Lotfi et al., 1997; Armelin e Lotfi, 1999), e células adrenocorticais normais bovinas e de rato (Hornsby e Gill, 1977; Mattos e Lotfi, 2005). Nossos achados mostram que o FGF2 induz um aumento de viabilidade e proliferação de forma dose-dependente e semelhante a resposta promovida pelo soro. Em trabalho anterior (Mattos e Lotfi, 2005) descrevemos que somente as células G, carenciadas para soro e tratadas com 0,05 nM de FGF2 por 24 h, apresentaram um aumento de núcleos marcados com BrdU, enquanto as células F/R não apresentaram aumento. Nesse estudo, mostramos através de tratamentos sustentados e prolongados por até 72 h em ensaio de viabilidade que ambos os tipos celulares são responsivos ao FGF2.

Nossos resultados do efeito biológico dos peptídeos sintéticos N-terminais da POMC₁₋₂₈ indicam que esses peptídeos são mitogênicos nas células G e F/R de rato. Estas observações concordam com as de Fassnacht et al. (2003) que observaram um aumento na proliferação de células tumorais humanas e de camundongos, linhagens NCI-H295 e Y1, após tratamento com um peptídeo N-POMC₁₋₂₈ humano sintético contendo as pontes dissulfeto. Resultados recentes do nosso laboratório que utilizaram ratos tratados com dexametasona e os peptídeos com e sem pontes dissulfeto, N-POMC^w e N-POMC^{w/o} (Mendonça e Lotfi, 2011), mostraram um aumento do número de núcleos marcados com BrdU no córtex adrenal para ambos os peptídeos. Embora a estratégia usual para prevenir a formação de pontes dissulfeto em peptídeos que contêm resíduos de cisteínas seja substituir as cisteínas por resíduos de serina, neste estudo tivemos como estratégia preservar o átomo de enxofre na cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos 2, 8, 20 e 24 e ao mesmo tempo prevenir a formação das pontes dissulfeto. Portanto, as

quatro cisteínas foram substituídas por quatro metioninas. Uma vez que o peptídeo contendo as metioninas mostrou ter atividade biológica, existe a possibilidade de que as propriedades conformacionais adquiridas pelo peptídeo sem as pontes sejam semelhantes as do peptídeo com as cisteínas. De forma meramente especulativa podemos sugerir, ao analisar as propriedades dos aminoácidos que compõem o peptídeo, que podem ocorrer interações hidrofóbicas das cadeias laterais dos grupos de metioninas com aquelas de leucinas, alaninas, interleucinas, fenilalaninas e triptofanos presentes no peptídeo, e que estas interações possam ser responsáveis pela conformação biologicamente ativa do peptídeo. Com relação à ausência de resposta das culturas primárias ao tratamento com N-POMC após sete dias em cultura, este resultado sugere que as condições de cultura fornecidas não sejam suficientes para manter as células responsivas a este tratamento. Muito pouco se sabe a respeito da ação desse peptídeo, além disso, seu receptor ainda é desconhecido. Os resultados *in vitro* descritos até o momento (Fassnacht et al., 2003; Pepper e Bicknell, 2009) são de células mantidas por até quatro dias em cultura.

O modelo *in vitro* utilizado neste trabalho, culturas primárias de células adrenocorticais de rato, se mostrou apropriado para a análise dos efeitos biológicos do FGF2 e do peptídeo N-terminal da POMC, o mesmo não ocorrendo para a observação da resposta biológica ao ACTH, uma vez que não foi possível reproduzir os resultados proliferativos descritos nos modelos *in vivo*. Em resumo, enquanto o FGF2 e os peptídeos N-POMC induzem proliferação em ambos os tipos celulares, tratamentos com ACTH mostram uma diminuição da proliferação e indução de apoptose, que ocorre nas células G de maneira precoce quando comparada com as células F/R, sugerindo uma maior resistência à ação do ACTH nesses tipos celulares.

5.3 A Análise das Vias de Sinalização e sua Inibição nas Células G e F/R

As células desenvolveram ferramentas sofisticadas para transmitir os sinais que chegam do meio extracelular e orquestrar as respostas. O mecanismo de sinalização de um agente envolve acoplamento de um efetor a um receptor,

produção de segundo(s) mensageiro(s), ativação de proteínas quinases e distribuição desses transdutores para alvos intracelulares específicos até a resposta biológica propriamente dita, como é o caso da proliferação celular. Além disso, há a interação entre vias que pode envolver seus componentes de forma paralela e/ou coincidente, assim como através de retro-alimentação positiva e negativa (Zhang e Liu, 2002).

5.3.1 A via MAPK-ERK

No nosso estudo a análise da ativação de ERK1/2 mostrou que FGF2 é capaz de fosforilar ERK1/2 nas células da cultura primária e que o ACTH interfere de forma negativa na sinalização iniciada por FGF2. Esses resultados reforçam resultados já publicados do nosso laboratório aonde mostramos que tratamentos de 10 - 60 min com FGF2 foram capazes de ativar ERK1/2 de maneira robusta e transiente por um mecanismo que pode ser regulado por PKA (Mattos e Lotfi, 2005).

A interferência negativa do ACTH sobre a fosforilação de ERK induzida por FGF2 pode ser devida a ativação de fosfatases e ainda pela ativação pelo ACTH de outras vias. De fato, Junttila et al. (2008) propõem essa hipótese demonstrando que p38 suprime a atividade pró-sobrevivência da via ERK. A partir desses resultados foi proposto um modelo de regulação entre as vias p38 e ERK em células não-imortalizadas. Esse modelo descreve, primeiramente, a ativação de MEK1-2 através de MEKK1-3 promovendo a sobrevivência celular em situações onde a apoptose ainda não é favorável (Karandikar et al., 2000). Entretanto, em circunstâncias em que a sinalização de estresse leva a ativação da proteína fosfatase 2A (PP2A) e a desfosforilação de MEK1-2 por p38, a sinalização pró-sobrevivência mediada por ERK1/2 é inibida, diminuindo o limiar para a apoptose induzida por p38 (Li et al., 2003). Durante a ativação sustentada de p38 há o aumento da expressão de fosfatases (MKPs) que regulam negativamente a via ERK (Breitwieser et al., 2007) e um aumento da interação física entre as proteínas p38 e ERK1/2 (Zhang et al., 2001) assegurando a inibição da atividade de ERK1/2 após a ativação transiente de PP2A. Finalmente, após a indução da apoptose, a degradação das proteínas Raf, MEK e ERK mediada por caspases representaria o estado final de remoção da

sinalização pró-sobrevivência (Widmann et al., 1998). Resumindo, essa cascata de eventos iniciada pela ativação de p38 desligaria a sinalização pró-sobrevivência e asseguraria a indução de apoptose induzida por estresse em células não-imortalizadas.

A via ERK também é ativada por ambos os peptídeos N-POMC utilizados, este resultado está em concordância com o que foi descrito em células de tumor adrenal humano, a linhagem NCI-H295, estimulada com 1-28 N-POMC^w humano (Fassnacht et al., 2003). A fosforilação de ERK nessas células ocorre entre 10 - 20 min após a estimulação com 10 μ M do peptídeo enquanto nas culturas primárias de adrenal de rato a mesma concentração fosforila ERK com diferentes cinéticas dependendo da presença ou ausência das pontes dissulfeto. Por outro lado e de maneira ainda não compreendida, concentrações menores que 10 μ M de N-POMC^w não ativaram ERK, mas promoveram aumento da viabilidade/proliferação em ambos os tipos celulares. Somado a isso, observamos que esse efeito proliferativo ocorre, pelo menos em parte, através da atividade de ERK, como observado quando utilizamos o inibidor específico de MEK, U0126. No entanto, N-POMC^{w/o} foi menos eficiente na promoção do efeito proliferativo, apesar de ativar ERK.

Algumas das concentrações de peptídeo N-POMC₁₋₂₈ utilizadas neste trabalho são provavelmente superiores às esperadas na circulação, embora em algumas situações as concentrações plasmáticas de N-POMC₁₋₂₈ possam ser de uma a duas ordens de grandeza superiores às concentrações plasmáticas de ACTH como descrito por Fassnacht et al. (2003).

O papel individual das duas isoformas de ERK ainda está para ser esclarecido. A análise de camundongos *knockouts* para ERK1 p44 (p44 MAPK^{-/-}) mostrou que os animais são viáveis, férteis e de tamanho normal. Embora Pages et al. (1999) tenham observado que ERK1 p44 é aparentemente dispensável e que ERK2 p42 compensa sua perda, eles encontraram uma redução de 50% na maturação de timócitos, sugerindo um papel específico para ERK1 no desenvolvimento dessas células. Por outro lado, Selcher et al. (2001), também utilizando animais *knockouts* para ERK1, não encontraram nenhuma mudança compensatória na expressão de ERK2 (p42 MAPK) em regiões do sistema nervoso central. Nos nossos estudos não observamos nenhuma mudança compensatória

entre ERK1 e ERK2, mas observamos respostas distintas das células G e F/R frente ao silenciamento simples ou duplo das isoformas de ERK, o que sugere papéis específicos de ERK1 e ERK2 dependendo do tipo celular.

5.3.2 A via MAPK-JNK

Resultados apresentados por Watanabe et al. (1997) mostram que ACTH ativa a via JNK nas células Y1, o que contrasta com os nossos resultados. As diferenças de ativação de JNK entre a linhagem Y1 e as células da cultura primária podem ser atribuídas às características tumorais da Y1, que apresenta c-Ras amplificado e constitutivamente ativado, entre outras alterações. Além disso, os resultados descritos por Otis et al. (2007) em culturas primárias mostram que o ACTH induz a fosforilação de JNK independente da matriz extracelular utilizada. A diferença entre os resultados pode estar relacionada às condições experimentais, pois o meio de cultivo celular utilizado foi o OptiMEM que contém peptídeos hipofisários derivados da pró-opiomelanocortina, que têm potencial mitogênico em células da suprarrenal (Bicknell et al., 2001).

A fosforilação de JNK por FGF2 nas culturas primárias, no entanto, era esperada uma vez que este tratamento induz o aumento da expressão de c-Jun, uma das proteínas efetadoras dessa via de sinalização (Polli, 2008). JNK é ativada em resposta a fatores de crescimento (Kyriakis e Avruch, 2001) e como consequência fosforila fatores de transcrição como c-Jun, ATF-2, p53 e Elk-1, que por sua vez regulam a expressão de um conjunto específico de genes que medeiam proliferação, diferenciação ou apoptose (Raman et al., 2007). O fato de FGF2 induzir a fosforilação de JNK e ERK (Mattos e Lotfi, 2005) sugere que estas proteínas são importantes componentes da cascata de sinalização proliferativa desencadeada pelo FGF2 nas células adrenocorticais. Enquanto o papel de ERK está bem documentado na indução da proliferação nas células Y1 (Lotfi et al., 1997) e em células adrenais normais (Mattos e Lotfi, 2005), o envolvimento de JNK é um fato novo. A utilização do inibidor específico de JNK e do siRNA para ERK impediu a resposta proliferativa desencadeada por tratamentos com FGF2. Nossos resultados estão de acordo com outros da literatura como os de Ahn et al. (2009) que mostraram ativação transiente

de JNK por FGF2, e também que o inibidor SP600125 é um dominante negativo de JNK1 reduzem significativamente a proliferação induzida por FGF2 em células tronco mesenquimais humanas. Assim como Makino et al. (2010) que investigando fibroblastos de pele humana em cultura descrevem que FGF2 aumenta o número de fibroblastos de forma dose e tempo-dependente. A proliferação induzida pelo FGF2 foi suprimida pela utilização dos inibidores de MEK (PD98059 e U0126) e JNK (SP600125). Por fim, transfecções com siRNA para ERK1, ERK2 ou JNK inibiram significativamente a proliferação induzida por FGF2.

Embora nós não tenhamos conseguido evidenciar nenhuma alteração na fosforilação de JNK, assim como Fassnacht et al. (2003), a inibição farmacológica específica mostrou que JNK tem um papel importante na proliferação induzida pelo N-POMC^{w/o}.

5.3.3 A via MAPK-p38

Apesar de não termos observado a fosforilação de p38 em experimentos de *immunoblottings*, a utilização do inibidor farmacológico de p38 (SB203580) mostrou que esta proteína pode mediar a resposta apoptótica desencadeada pelo ACTH. Este resultado está de acordo com a teoria proposta por Whitmarsh (2010) que propõem que p38 tem uma função central na resposta transcrricional precoce a um crescente número de estresses, como estresse osmótico, choque de temperatura e infecções.

Tratamentos de 15 min com FGF2 promoveram a fosforilação de p38 somente nas células G. Fernandes et al. (2004) investigando células de músculo liso de vias respiratórias humanas demonstraram que p38 é fosforilado por FGF2 e é responsável pela proliferação estimulada por ele. Quando utilizamos o inibidor farmacológico de p38, SB203580, não foi observada interferência na proliferação das células adrenais induzida pelo FGF2, nas células G ou F/R. Portanto, nas células adrenais *in vitro* não podemos fazer uma relação entre a ativação de p38 por FGF2 e proliferação.

A detecção da fosforilação de p38 após tratamentos com N-POMC^{w/o} difere dos resultados descritos por Fassnacht et al. (2003). A diferença na observação da

ativação ou não desta via pode ser devida as metodologias utilizadas como a utilização de N-POMC₁₋₂₈ de rato vs. N-POMC₁₋₂₈ de humano, a ausência vs. presença das pontes dissulfeto e culturas primárias de suprarenal normal de rato vs. linhagens de células tumorais humanas e de camundongos.

5.3.4 A via PKA e PKC

Os resultados da ativação de CREB em ambos os tipos celulares por FGF2, ACTH, e tratamentos conjuntos (A+F) corroboram resultados anteriores descritos em Mattos e Lotfi (2005) em que o ACTH e um análogo de cAMP, o 8-bromo-cAMP, estimulam a fosforilação de CREB tanto nas células normais da cultura primária como na linhagem tumoral Y1, de maneira parcialmente dependente de PKA. Embora esteja descrito que tratamentos com ACTH levam à abertura de canais de cálcio e à ativação de fosfolipase C nas células G (Gallo-Payet e Payet, 2003), nossos resultados mostram que a inibição farmacológica de PKA ou PKC, isolada ou combinadamente, não interfere na resposta do ACTH. Embora a ativação de CREB seja a resposta mais evidente promovida pelo ACTH, o que sugere sua mediação na apoptose induzida por esse fator, a inibição específica de CREB por siRNA foi incapaz de reverter esse efeito.

A fosforilação de CREB pelo peptídeo N-POMC ainda não havia sido descrita, mas não era inesperada, uma vez que os peptídeos N-terminais da POMC estimulam um fraco efeito esteroidogênico, que se dá através de PKA e CREB (Estivariz et al., 1982; Lowry et al., 1983; 1984; Schimmer, 1980).

5.3.5 A via PKB (Akt)

Forti et al. (2002) mostraram que a linhagem Y1 apresenta Akt fosforilada constitutivamente, provavelmente devido aos níveis cronicamente elevados de c-Ki-Ras-GTP e PI3K. Ao contrário de FGF2, que é um potente ativador dessa kinase, o ACTH promove uma rápida desfosforilação de Akt nas células Y1. Como a via de Akt está envolvida no controle das proteínas da maquinaria pró-apoptose (Brunet et al., 1999), nossa hipótese era que o ACTH promovesse a desfosforilação de Akt

facilitando a ativação de vias pró-apoptose nas células adrenocorticais normais. Resultados não mostrados da análise da ativação de Akt por fosforilação do resíduo treonina (Thr-308) nas células Y1 tratadas com FGF2 mostraram fosforilação de Akt entre 5 min e 2 h de tratamento. Entretanto, a análise de Akt nas culturas primárias revelou total ausência da fosforilação do resíduo de Thr, mesmo com o aumento da concentração de proteína total utilizada. Segundo Vlahos et al. (1994) a fosforilação no resíduo Ser-473 parece ser o passo mais importante na ativação de PKB/Akt por ser capaz de estabilizar o domínio kinase em um estado de conformação ativo quase idêntico àquele encontrado na subunidade catalítica fosforilada e ativada de PKA. Somado a isso, observamos que a cinética de fosforilação de Akt-Ser por ACTH e FGF2 difere entre as células G e F/R de forma semelhante àquela descrita para a fosforilação de ERK com FGF2 (Mattos e Lotfi, 2005), enquanto as células F/R apresentaram uma diminuição precoce da fosforilação de Akt, as células G apresentam uma ativação sustentada de por até 30 minutos com ambos os tratamentos. Apesar do clássico envolvimento de Akt com a sinalização pró-sobrevivência, sua ativação com tratamentos de ACTH não é suficiente para impedir o efeito apoptótico. Portanto, o que podemos sugerir é que a ação de outras vias, por exemplo p38, está determinando a resposta biológica final, apesar da fosforilação de Akt.

Tratamentos de 15 min com N-POMC^{w/o} levam a fosforilação no resíduo de serina de Akt, corroborando evidências anteriores de Pepper e Bicknell (2009). Entretanto o papel de Akt na sinalização proliferativa de N-POMC^{w/o}, evidenciado através de inibição farmacológica de PI3K com wortmanina, é um fato novo.

6 CONCLUSÕES

Em resumo, podemos dizer que a caracterização da cultura primária foi de importância fundamental para comprovação da qualidade dos procedimentos e dá suporte a um modelo que se provou útil na análise de alguns aspectos da fisiologia de células adrenais isoladas.

A análise dos efeitos biológicos mostrou que os peptídeos N-POMC e o FGF2 promovem a proliferação celular enquanto o ACTH estimula progressiva perda de atividade metabólica e viabilidade, diminuição da proliferação com consequente morte por apoptose, sem o envolvimento de eventos autofágicos ou de senescência.

Mostramos que a sinalização mediadora do efeito proliferativo do FGF2 se dá através das vias ERK e JNK; os peptídeos N-POMC se utilizam da ativação de ERK, JNK e Akt para promoverem seus efeitos proliferativos; enquanto a sinalização pró-apoptótica estimulada pelo ACTH é através da via p38, provavelmente associada a ausência de fosforilação de ERK e JNK.

A ação apoptótica ou inibitória do ACTH se mostrou predominante sobre os efeitos proliferativos ou estimuladores do FGF2 e da N-POMC na maioria dos tratamentos conjuntos, o que descarta a possibilidade destes fatores serem os responsáveis pelo paradigma observado do efeito mitogênico do ACTH *in vivo* e *in vitro*.

As tabelas a seguir mostram de forma simplificada e comparativa as vias de sinalização ativadas pelos peptídeos ACTH, FGF2 e N-terminal da POMC e o efeito biológico promovido por esses fatores em células isoladas da suprarrenal de rato (Tabelas 3-6).

Tabela 3 - Vias de sinalização ativadas pelo ACTH, FGF2, tratamentos conjuntos de A+F e peptídeos N-POMC₁₋₂₈ com (NPOMC^w) e sem pontes dissulfeto (NPOMC^{w/o}) nas células Glomerulosas (G) de culturas primárias de suprarenal de rato.

células G					
	ACTH	FGF2	A+F	NPOMC ^{w/o}	NPOMC ^w
ERK	=	+++	++	++	++
JNK	-	+++	++	=	
p38	=	++	=	=	
CREB	++	+	++	=	
Akt	+	++	+++	+	

(-) diminuição da fosforilação; (=) nível de fosforilação igual; (+), (++) e (+++) aumentos progressivos da fosforilação, em relação ao controle não-tratado.

Tabela 4 - Vias de sinalização ativadas pelo ACTH, FGF2, tratamentos conjuntos de A+F e peptídeos N-POMC₁₋₂₈ com (NPOMC^w) e sem pontes dissulfeto (NPOMC^{w/o}) nas células Fasciculadas/Reticuladas (F/R) de culturas primárias de suprarenal de rato.

células F/R					
	ACTH	FGF2	A+F	NPOMC ^{w/o}	NPOMC ^w
ERK	=	+++	+	+	+
JNK	=	+	-	=	
p38	=	=	=	++	
CREB	++	+	++	++	
Akt	+	++	+++	=	

(-) diminuição da fosforilação; (=) nível de fosforilação igual; (+), (++) e (+++) aumentos progressivos de fosforilação, em relação ao controle não-tratado.

Tabela 5 - Efeitos biológicos induzidos pelo ACTH, FGF2, tratamentos conjuntos de A+F e A+P^{w/o}, peptídeos N-POMC₁₋₂₈ com (NPOMC^w) e sem pontes dissulfeto (NPOMC^{w/o}) e ação dos inibidores das vias de sinalização nas células Glomerulosas (G) de culturas primárias de suprarenal de rato.

células G						
	ACTH	FGF2	A+F	NPOMC ^w	NPOMC ^{w/o}	A+P ^{w/o}
Efeito Biológico	- -	++	- -	++	+	- -
U0126 (MEK/ERK)		=		=	-	
SP600125 (JNK)	- -	-	- -		-	- -
SP203580 (p38)	-	++	=		-	-
H89 (PKA/CREB)	- -					
bisindolilmaleimida (PKC/CREB)	- -					
wortmanina (PI3K/Akt)	- -	++	- -		=	- -

(=) viabilidade/proliferação igual; (-) e (- -) efeitos citotóxicos progressivos; (+) e (++) efeitos proliferativos progressivos, em relação ao controle não-tratado.

Tabela 6 - Efeitos biológicos induzidos pelo ACTH, FGF2, tratamentos conjuntos de A+F e A+P^{w/o}, peptídeos N-POMC₁₋₂₈ com (NPOMC^w) e sem pontes dissulfeto (NPOMC^{w/o}) e ação dos inibidores das vias de sinalização nas células Fasciculadas/Reticuladas (F/R) de culturas primárias de suprarenal de rato.

	células F/R					
	ACTH	FGF2	A+F	NPOMC ^w	NPOMC ^{w/o}	A+P ^{w/o}
Efeito Biológico	- -	++	- -	+	++	- -
U0126 (MEK/ERK)		=		=	-	
SP600125 (JNK)	- -	=	- -		-	- -
SP203580 (p38)	=	+	+		-	+
H89 (PKA/CREB)	- -					
bisindolilmaleimida (PKC/CREB)	- -					
wortmanina (PI3K/Akt)	- -	++	- -		-	- -

(=) viabilidade/proliferação igual; (-) e (- -) efeitos citotóxicos progressivos; (+) e (++) efeitos proliferativos progressivos, em relação ao controle não-tratado.

REFERÊNCIAS*

Aguilera G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol.* 1994 Dec;15(4):321-50.

Ahn HJ, WJ, Kwack K, Kwon YD. FGF2 stimulates the proliferation of human mesenchymal stem cells through the transient activation of JNK signaling. *FEBS Letters.* 2009 Sep 3;583(17):2922-6.

Armato U, Andreis PG, Draghi E, Meneghelli V. Primary tissue culture of normal adult human decapsulated adrenal cortex: radioautographic studies on the metabolic effects of ACTH1-24. *Horm Res.* 1975;6(2):105-15.

Armelin HA. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Sep;70(9):2702-6.

Armelin HA, Lotfi CF. Control of the adrenocortical cell cycle: interaction between FGF2 and ACTH. *Braz J Med Biol Res.* 1999 Jul;32(7):841-3.

Arola J, Heikkila P, Kahri AI. Biphasic effect of ACTH on growth of rat adrenocortical cells in primary culture. *Cell Tissue Res.* 1993 Jan;271(1):169-76.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97.

Bicknell AB, Lomthaisong K, Woods RJ, Hutchinson EG, Bennett HP, Gladwell RT, et al. Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. *Cell.* 2001 Jun 29;105(7):903-12.

Biology Reference. Adrenal Gland. 2011. Available from: <http://www.biologyreference.com/A-Ar/Adrenal-Gland.html>. [2011 Jan 30]

Bottcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev.* 2005 Feb;26(1):63-77.

Boulle N, Gicquel C, Logie A, Christol R, Feige JJ, Le Bouc Y. Fibroblast growth factor-2 inhibits the maturation of pro-insulin-like growth factor-II (Pro-IGF-II) and the expression of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in the human adrenocortical tumor cell line NCI-H295R. *Endocrinology*. 2000 Sep;141(9):3127-36.

Bowen R. Pathophysiology of the endocrine system, Functional Anatomy of the Adrenal Gland. Colorado State University. 2002. Available from: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/adrenal/anatomy.html>. [2011 Jan 30].

Breitwieser W, Lyons S, Flenniken AM, Ashton G, Bruder G, Willington M, et al. Feedback regulation of p38 activity via ATF2 is essential for survival of embryonic liver cells. *Genes Dev*. 2007 Aug 15;21(16):2069-82.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999 Mar 19;96(6):857-68.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):513-22.

Carsia RV, Macdonald GJ, Gibney JA, Tilly KI, Tilly JL. Apoptotic cell death in the rat adrenal gland: an in vivo and in vitro investigation. *Cell Tissue Res*. 1996 Feb;283(2):247-54.

Carsia RV, Tilly KI, Tilly JL. Hormonal modulation of apoptosis in the rat adrenal gland in vitro is dependent on structural integrity. *Endocrine*. 1997 Dec;7(3):377-81.

Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642-55.

Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*. 1995 Jun 23;270(25):14843-6.

Colonna C, Podesta EJ. ACTH-induced caveolin-1 tyrosine phosphorylation is related to podosome assembly in Y1 adrenal cells. *Exp Cell Res*. 2005 Apr 1;304(2):432-42.

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991 Jul;3(7):207-12.

Costa ET, Forti FL, Matos TG, Dermargos A, Nakano F, Salotti J, et al. Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6215-23.

Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.* 2003 Apr;206(Pt 7):1107-15.

d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev.* 2004 Aug 1;18(15):1781-99.

Dângelo JG, Fattini CA. *Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar.* 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007. Cap. 14, p. 199-203: Sistema Endócrino.

Denhardt DT. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J.* 1996 Sep 15;318(Pt 3):729-47.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 26;92(20):9363-7.

Dougherty CJ, Kubasiak LA, Prentice H, Andreka P, Bishopric NH, Webster KA. Activation of c-Jun N-terminal kinase promotes survival of cardiac myocytes after oxidative stress. *Biochem J.* 2002 Mar 15;362(Pt 3):561-71.

Eaton MJ, Duplan H. Useful cell lines derived from the adrenal medulla. *Molecular and cellular endocrinology.* 2004 Dec 30;228(1-2):39-52.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 May 24;411(6836):494-8.

Estivariz FE, Iturriza F, McLean C, Hope J, Lowry PJ. Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides. *Nature.* 1982 Jun 3;297(5865):419-22.

Estivariz FE, Carino M, Lowry PJ, Jackson S. Further evidence that N-terminal pro-opiomelanocortin peptides are involved in adrenal mitogenesis. *The Journal of endocrinology*. 1988 Feb;116(2):201-6.

Fassnacht M, Hahner S, Hansen IA, Kreutzberger T, Zink M, Adermann K, et al. N-terminal proopiomelanocortin acts as a mitogen in adrenocortical tumor cells and decreases adrenal steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 May;88(5):2171-9.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 1998 Jul 17;273(29):18623-32.

Feige JJ, Vilgrain I, Brand C, Bailly S, Souchelnitskiy S. Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors. *J Endocrinol*. 1998 Jul;158(1):7-19.

Fernandes DJ, Ravenhall CE, Harris T, Tran T, Vlahos R, Stewart AG. Contribution of the p38MAPK signalling pathway to proliferation in human cultured airway smooth muscle cells is mitogen-specific. *British Journal of Pharmacology*. 2004 Aug;142(7):1182-90.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987 Jan 23;235(4787):442-7.

Forti FL, Schwindt TT, Moraes MS, Eichler CB, Armelin HA. ACTH promotion of p27(Kip1) induction in mouse Y1 adrenocortical tumor cells is dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation. *Biochemistry*. 2002 Aug 6;41(31):10133-40.

Forti FL, Dias MH, Armelin HA. ACTH receptor: ectopic expression, activity and signaling. *Mol Cell Biochem*. 2006 Dec;293(1-2):147-60.

Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*. 1995 Jun 2;81(5):727-36.

Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.; 2005. 642 p.

Frigeri CK, Armelin HA. Patterns of long-term steroidogenesis stimulation by ACTH and phorbol ester. *Braz J Med Biol Res*. 1996 Mar;29(3):343-5.

Gallo-Payet N, Chouinard L, Balestre MN, Guillon G. Dual effects of dopamine in rat adrenal glomerulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Nov 15;172(3):1100-8.

Gallo-Payet N, Payet MD. Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech.* 2003 Jun 15;61(3):275-87.

Gambarini AG, Armelin HA. Purification and partial characterization of an acidic fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem.* 1982 Aug 25;257(16):9692-7.

Gassel M, Breitenlechner CB, König N, Huber R, Engh RA, Bossemeyer D. The protein kinase C inhibitor bisindolyl maleimide 2 binds with reversed orientations to different conformations of protein kinase A. *J Biol Chem.* 2004 May 28;279(22):23679-90.

Gospodarowicz D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem.* 1975 Apr 10;250(7):2515-20.

Gospodarowicz D, Handley HH. Stimulation of division of Y1 adrenal cells by a growth factor isolated from bovine pituitary glands. *Endocrinology.* 1975 Jul;97(1):102-7.

Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Jul;73(7):2424-8.

Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 1998 Jan 23;273(4):1839-42.

He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43:67-93.

Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat.* Germany: BioMed Verlag, 1986. Part H, p. 92-93: Endocrine Organs.

Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell.* 2004 May 21;14(4):501-13.

Herbig U, Sedivy JM. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev.* 2006 Jan;127(1):16-24.

Hornsby PJ, Gill GN. Hormonal control of adrenocortical cell proliferation. Desensitization to ACTH and interaction between ACTH and fibroblast growth factor in bovine adrenocortical cell cultures. *J Clin Invest.* 1977 Aug;60(2):342-52.

Hornsby PJ. Regulation of adrenocortical cell proliferation in culture. *Endocr Res.* 1984;10(3-4):259-81.

Ingle DJ, Kendall EC. Atrophy of the Adrenal Cortex of the Rat Produced by the Administration of Large Amounts of Cortin. *Science.* 1937 Sep 10;86(2228):245.

Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev.* 2007 Jan;128(1):36-44.

Jeyapalan JC, Sedivy JM. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev.* 2008 Jul-Aug;129(7-8):467-74.

Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters.* 2010 Apr 2;584(7):1287-95.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica.* 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 20, p. 390-414: Glândulas Endócrinas.

Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *Faseb J.* 2008 Apr;22(4):954-65.

Karandikar M, Xu S, Cobb MH. MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *J Biol Chem.* 2000 Dec 22;275(51):40120-7.

Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 1997 Mar 15;11(6):701-13.

Klagsbrun M, Baird A. A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell.* 1991 Oct 18;67(2):229-31.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994 Sep 1;84(5):1415-20.

Koopman R, Schaart G, Hesselink MK. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol*. 2001 Jul;116(1):63-8.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):807-69.

Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006 Apr;5(2):187-95.

Li SP, Junttila MR, Han J, Kahari VM, Westermarck J. p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase1,2. *Cancer Res*. 2003 Jul 1;63(13):3473-7.

Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*. 2003 Jan;25(1):17-24.

Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2007 Mar;7(3):202-12.

Lotfi CF, Todorovic Z, Armelin HA, Schimmer BP. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem*. 1997 Nov 21;272(47):29886-91.

Lowry PJ, Silas L, McLean C, Linton EA, Estivariz FE. Pro-gamma-melanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth. *Nature*. 1983 Nov 3-9;306(5938):70-3.

Lowry PJ, Estivariz FE, Silas L, Linton EA, McLean C, Crocombe K. The case for pro-gamma-MSH as the adrenal growth factor. *Endocr Res*. 1984;10(3-4):243-58.

Makino T, Jinnin M, Muchemwa FC, Fukushima S, Kogushi-Nishi H, Moriya C, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of human dermal fibroblasts via the ERK1/2 and JNK pathways. *Br J Dermatol*. 2010 Apr;162(4):717-23.

Masui H, Garren LD. Inhibition of replication in functional mouse adrenal tumor cells by adrenocorticotrophic hormone mediated by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Dec;68(12):3206-10.

Mattos GE, Lotfi CF. Differences between the growth regulatory pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line. *Molecular and cellular endocrinology*. 2005 Dec 21;245(1-2):31-42.

Mello CC, Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):338-42.

Mendonça PO, Lotfi CF. The proliferative effect of synthetic N-POMC(1-28) peptides in rat adrenal cortex: A possible role for cyclin E. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011 Apr 10;336(1-2):156-61.

Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol Cell Biol*. 1996 Mar;16(3):977-89.

Moore PS, Couch RM, Perry YS, Shuckett EP, Winter JS. Allgrove syndrome: an autosomal recessive syndrome of ACTH insensitivity, achalasia and alacrima. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1991 Feb;34(2):107-14.

Moore KL. *Anatomia Orientada para a Clínica*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. Cap. 2, p. 113-215: O Abdome.

Morera AM, Saez JM. In vitro mitogenic and steroidogenic effects of ACTH analogues on an adrenal tumor cell line (Y-1). *Exp Cell Res*. 1980 Jun;127(2):446-51.

Muller J, Pfeifer U, Dammrich J. Inhibited autophagic degradation during ACTH-stimulated growth of rat adrenal zona fasciculata. *Virchows Archiv*. 1987;52(5):429-41.

Nemeroff CB. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry*. 1996 Sep;1(4):336-42.

Netter FH. *Atlas de Anatomia Humana*. 4ª ed. São Paulo: Saunders-Elsevier, 2008. Prancha 347: Rins e Glândulas Suprarrenais.

New MI. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Annu Rev Med.* 1998;49:311-28.

Novak KM. *Drug Facts and Comparisons*. 56th ed. St. Louis, Missouri: Wolters Kluwer Health. 2002. p. 619: Dimethyl sulfoxide.

Oertle M, Muller J. Two types of cytochrome P-450(11 beta) in rat adrenals: separate regulation of gene expression. *Molecular and cellular endocrinology.* 1993 Feb;91(1-2):201-9.

Ogishima T, Mitani F, Ishimura Y. Isolation of aldosterone synthase cytochrome P-450 from zona glomerulosa mitochondria of rat adrenal cortex. *J Biol Chem.* 1989 Jul 5;264(19):10935-8.

Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N. Angiotensin II stimulates protein synthesis and inhibits proliferation in primary cultures of rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 2005 Feb;146(2):633-42.

Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. *J Endocrinol.* 2007 Jun;193(3):331-47.

Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science.* 1999 Nov 12;286(5443):1374-7.

Parmar J, Key RE, Rainey WE. Development of an adrenocorticotropin-responsive human adrenocortical carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Nov;93(11):4542-6.

Pepper DJ, Bicknell AB. The stimulation of mitogenic signaling pathways by N-POMC peptides. *Molecular and cellular endocrinology.* 2009 Mar 5;300(1-2):77-82.

Pignolo RJ, Martin BG, Horton JH, Kalbach AN, Cristofalo VJ. The pathway of cell senescence: WI-38 cells arrest in late G1 and are unable to traverse the cell cycle from a true G0 state. *Exp Gerontol.* 1998 Jan-Mar;33(1-2):67-80.

Polli S. Análise da Expressão das proteínas dos genes de resposta primária, proteínas das famílias Fos e Jun, em culturas primárias de supra-renal de rato tratadas com ACTH e FGF2. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)].

São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Popesko P, Rejtová V, Horak J. A Colour Atlas of the anatomy of small laboratory animals. Vol. 2 rats, mouse and golden hamster. 2th ed. Philadelphia: Saunders Book Company; 2002.

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000 Sep;7(3):165-97.

Ramachandran J, Suyama AT. Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Jan;72(1):113-7.

Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3100-12.

Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Bertagna X, Bertherat J. Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun;968:65-74.

Schimmer BP. Cyclic nucleotides in hormonal regulation of adrenocortical function. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 1980;13:181-214.

Schimmer BP, Cordova M, Cheng H, Tsao A, Morris Q. A genome-wide assessment of adrenocorticotropin action in the Y1 mouse adrenal tumor cell line. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007 Feb;265-266:102-7.

Schwindt TT, Forti FL, Juliano MA, Juliano L, Armelin HA. Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. *Biochemistry*. 2003 Feb 25;42(7):2116-21.

Selcher JC, Nekrasova T, Paylor R, Landreth GE, Sweatt JD. Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learn Mem*. 2001 Jan-Feb;8(1):11-9.

Shepherd SP, Holzwarth MA. Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jan;280(1):C61-71.

Simonian MH, Gill GN. Regulation of the fetal human adrenal cortex: effects of adrenocorticotropin on growth and function of monolayer cultures of fetal and definitive zone cells. *Endocrinology*. 1981 May;108(5):1769-79.

Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol*. 1988;50:427-40.

Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*. 1988 Mar 17;332(6161):217-9.

Stewart PM. The Adrenal Cortex. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams Textbook of Endocrinology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2008. p. 445-537.

Stromhaug PE, Klionsky DJ. Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic*. 2001 Aug;2(8):524-31.

Torres TE, Lotfi C F. Distribution of cells expressing Jun and Fos proteins and synthesizing DNA in the adrenal cortex of hypophysectomized rats: regulation by ACTH and FGF2. *Cell Tissue Res*. 2007 Sep;329(3):443-55.

Torres TE, de Mendonca PO, Lotfi CF. Synthetic modified N-POMC(1-28) controls in vivo proliferation and blocks apoptosis in rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res*. 2010 Aug;341(2):239-50.

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1991 Aug 25;266(24):15771-81.

Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Feb;10(2):116-29.

van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998 Jan 1;31(1):1-9.

Van Limbergen J, Stevens C, Nimmo ER, Wilson DC, Satsangi J. Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal immunology*. 2009 Jul;2(4):315-30.

Vinson GP. Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc Res Tech.* 2003 Jun 15;61(3):227-39.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 1994 Feb 18;269(7):5241-8.

Vrezas I, Willenberg HS, Mansmann G, Hiroi N, Fritzen R, Bornstein SR. Ectopic adrenocorticotropin (ACTH) and corticotropin-releasing hormone (CRH) production in the adrenal gland: basic and clinical aspects. *Microsc Res Tech.* 2003 Jun 15;61(3):308-14.

Watanabe G, Pena P, Albanese C, Wilsbacher LD, Young JB, Pestell RG. Adrenocorticotropin induction of stress-activated protein kinase in the adrenal cortex in vivo. *J Biol Chem.* 1997 Aug 8;272(32):20063-9.

Weidman RE, Gill GN. Differential effects of ACTH or 8-Dr-cAMP on growth and replication in a functional adrenal tumor cell line. *J Cell Physiol.* 1977 Jan;90(1):91-103.

Wellstein A, Lupu R, Zugmaier G, Flamm SL, Cheville AL, Delli Bovi P, et al. Autocrine growth stimulation by secreted Kaposi fibroblast growth factor but not by endogenous basic fibroblast growth factor. *Cell Growth Differ.* 1990 Feb;1(2):63-71.

Whitmarsh AJ. A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. *BMC Biology.* 2010; 8:47.

Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem.* 1998 Mar 20;273(12):7141-7.

Wood MA, Hammer GD. Adrenocortical stem and progenitor cells: Unifying model of two proposed origins. *Molecular and cellular endocrinology.* 2011 Apr 10;336(1-2):206-12.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991 Feb 22;64(4):841-8.

Zhang H, Shi X, Hampong M, Blanis L, Pelech S. Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. J Biol Chem. 2001 Mar 9;276(10):6905-8.

Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res. 2002 Mar;12(1):9-18.

ANEXOS

ANEXO A – Mattos e Lotfi, 2005.

Mattos GE, Lotfi CF. Differences between the growth regulatory pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line. Molecular and cellular endocrinology. 2005 Dec 21;245(1-2):31-42

Differences between the growth regulatory pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line

Gabriele E. Mattos, Claudimara F.P. Lotfi*

Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, Universidade of São Paulo, São Paulo 05508-900, SP, Brazil

Received 1 April 2005; received in revised form 20 September 2005; accepted 6 October 2005

Abstract

In this study, DNA synthesis, phosphorylation of ERK1/2 and CREB proteins, as well as induction of c-Fos protein, were examined in rat adrenocortical, glomerulosa and fasciculata/reticularis cells, as well as in the Y1 cell line. We found that FGF2 was mitogenic only in glomerulosa cells and although ACTH did not activate ERK1/2, it did activate CREB protein, indicating efficient transduction of signals initiated in the ACTH receptors of rat adrenocortical cells. The FGF2 activated ERK1/2 in rat adrenal cells by a mechanism that might be modulated by upstream PKA pathway phosphorylation of MEK and despite the nonmitogenic effect of ACTH on rat adrenal cells it effectively induces c-Fos protein. The results presented herein describe distinct differences between the ACTH and FGF2 signal transduction mechanisms seen in adrenocortical cells and those observed in the Y1 cell line, indicating that, in vitro, ACTH blockage of the mitogenic effect occurs in normal adrenal cells after induction of c-Fos protein.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Rat adrenal culture cells; Corticotropin; Fibroblast growth factor 2; ERK; c-Fos

1. Introduction

In the Y1 mouse adrenocortical tumor cell line, growth regulatory pathways initiated in adrenal cell receptors have been fairly well characterized (Rocha et al., 2003). In G₀/G₁ cell cycle-arrested Y1 cells, extracellular FGF2 triggers a fibroblast-like mitogenic response. This response comprises activation of both ERK and PI3K pathways (Lotfi et al., 1997; Forti et al., 2002); induction of fos, jun and myc family early response genes (Kimura et al., 1993); and induction of secondary response genes such as cyclin D1 (Schwindt et al., 2003) and S entry (Lotfi et al., 1997). Short ACTH pulses prior to G₁ checkpoints induce cell cycle progression in the Y1 cell line by promoting the transition from G₁ to S phase. This transition includes phosphorylation of ERK1/2, as well as transcription and expression of Fos and Jun families, but not c-Myc protein activity (Lotfi et al., 1997; Lepique et al., 2000). In contrast, prolonged administration of ACTH during the G₁ phase arrests cell growth by blocking the transition from G₁ to S phase and antagonizes FGF2 mitogenic activity, blocking S-phase entry of Y1 cells. The blocking

effect triggered by ACTH promotes dephosphorylation of the Akt/PKB enzyme, which is constitutively phosphorylated in the Y1 cell line, and degradation of c-Myc protein (Lepique et al., 2004). One characteristic of the Y1 cell line is greater amplification of the c-Ki-ras proto-oncogene (Schwab et al., 1983), which seems necessary for the malignancy displayed by this tumor cell. The increased c-Ki-ras-GTP and PI3K activity contributes to high constitutive levels of phosphorylated Akt/PKB in the Y1 cell line (Forti et al., 2002).

The MAPK/ERK cascade and induction of c-Fos protein have been used as biochemical markers immediately downstream of hormone and growth factors receptors to evaluate their mitogenic potential. In order to characterize the specialized endocrine signals initiated in the ACTH and FGF2 receptors of adrenocortical cells, we investigated ERK1/2 and the nuclear localization of c-Fos in rat adrenocortical cells, isolating zona glomerulosa (G) cells and zona fasciculata/reticularis (F/R) cells. We found that ACTH did not stimulate S-phase entry of adrenal cells in primary culture, in contrast with what had been previously observed in the Y1 cell line (Lotfi et al., 1997). We also found that, in rats, FGF2 stimulates strong, although transient, activation of the ERK pathway, as well as c-Fos induction, in both G cells and F/R cells. This FGF2-induced c-Fos was so weak that it did not induce S-phase entry in F/R cells, although it did so in G cells. In

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 7492; fax: +55 11 3091 7366.
E-mail address: clotfi@usp.br (C.F.P. Lotfi).

contrast, ACTH did not stimulate ERK phosphorylation in dispersed G and F/R cells but did trigger strong induction of c-Fos. In addition, we found that FGF2-induced c-Fos is coordinated through cross talk between the ERK and PKA pathways. Our results suggest that the ACTH-related blockage of the mitogenic effect in adrenal cells occurs downstream of c-Fos induction.

2. Material and methods

2.1. Cell line culture

The Y1 mouse adrenocortical tumor cell line (Yasumura et al., 1966) was purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and adapted to grow in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FCS) at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂. To arrest the cell cycle at the G₀–G₁ boundary, Y1 cells growing exponentially in DMEM/10% FCS were incubated for 48 h in serum-free medium (SFM).

2.2. Adrenocortical cells in primary culture

Adult male Wistar rats (body weight, 260 ± 40 g) were purchased from the Biomedical Institute of Science, University of São Paulo, and the Local Ethics Care Committee approved the protocol of the experiment. The rats were decapitated, and the adrenal glands were promptly removed. Adherent adipose tissue was cleaned from the adrenal glands, which were then gently decapsulated to separate G cells from inner-zone F/R cells and medulla that did not survive after seeding. Dispersed G and F/R cells were obtained by sequential collagenase digestion and mechanical disaggregation (Haning et al., 1970 and Gallo-Payet et al., 1990). We obtained approximately 10⁵ cells/gland of G cells and 2 × 10⁵ cells/gland of F/R cells. Dispersed G and F/R cells were suspended in DMEM containing 10% FCS, 25 mg/l of ampicillin and 100 mg/l of streptomycin, and then plated in 60-mm Falcon primary tissue culture dishes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) or onto 13-mm Thermanox™ Coverslips (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA). Cells were seeded at a density of 10⁵ cells/dish (Western blot experiments) and 2–3 × 10⁴ cells/coverslip (immunocytochemistry experiments). Prior to their use, cells were cultured for 48 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂. After 24, 48, and 72 h of seeding dispersed G cells and F/R cells were examined under phase contrast microscopy, fixed in 3.7% formaldehyde and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The morphological analysis showed that more than 98% of cells were epithelial-like, containing refractive droplets or dark granules, whereas fibroblasts-like cells accounted for less than 0.1% of the cell population. In an eosinophilic cytoplasm, G cells presented fewer refractive droplets when fully spread out, whereas the F/R cells displayed a vacuolated and clear cytoplasm, with many lipid inclusions.

2.3. Dye exclusion viability of primary culture cells after serum starving

In 24-well Falcon primary tissue culture dishes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), 10⁵ cells/ml/well of G cells and F/R cells were plated in DMEM/10% FCS and placed in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂ for 24 h. The culture cells were subsequently maintained in DMEM/0.5% FCS for 24 h (day 1), 48 h (day 2) or 72 h (day 3). On each day, the seeded cells of three wells were dispersed, mixed with 0.4% Trypan Blue for a determined period of time, and counts of stained cells and the total cells were performed with a hemocytometer. The percentage of unstained cells, corresponding to cell viability, was calculated.

2.4. Incorporation of bromodeoxyuridine into DNA

As reported in Lotfi et al. (2000) and Lotfi and Armelin (2001), there are differences between the patterns of mitogenic activity of ACTH and FGF2 in Y1 cells. The concentration–response curve of c-Fos and DNA synthesis to FGF2 is linearly correlated (0.1–1000 pM for FGF2 with an ED50% of approximately

Table 1
Effects of ACTH and FGF2 treatment on BrdU incorporation in Y1 and primary culture cells

Cell type	Treatment	Labeled nuclei (%)	
		0–2 h	0–24 h
Y1 cell line	None	10 (1)*	13.7 (1)
	ACTH	19.1 (1.91)**	5 (0.36)**
	FGF2	38 (3.8)**	45 (3.28)**
	ACTH + FGF2	20.1 (2.01)**	9 (0.65)**
G cells	None	2 (1)	2 (1)
	ACTH	1.9 (0.95)	0.85 (0.425)**
	FGF2	1.5 (0.75)	5 (2.5)**
	ACTH + FGF2	2 (1)	2.2 (1.1)
F/R cells	None	1.0 (1)	1.2 (1)
	ACTH	0.85 (0.85)	0.9 (0.75)
	FGF2	1.0 (1)	1.5 (1.25)
	ACTH+FGF2	1.1 (1.1)	1.1 (0.91)

Y1 and primary culture cells (glomerulosa (G) and fasciculata/reticularis (F/R) cells) were plated onto coverslips, serum-starved for 48 h in serum-free medium (SFM) or 24 h in DMEM/0.5% FCS, respectively, then either untreated or treated with ACTH (10^{−9} M) or FGF2 (1 ng/ml) for the time indicated. After 2 h of treatment, cells were washed and transferred to SFM for the remainder of the incubation. Samples from all experimental groups were incubated with 100 μM of BrdU for 12–24 h and processed to estimate percentages of BrdU-labeled nuclei. Data from three independent experiments were aggregated to estimate the percentage of labeled nuclei to generate each point presented; 2000–3000 nuclei were counted for each condition. Statistical significance was determined by χ^2 analysis with 1 d.f.

* Fold stimulation over control.

** $p < 0.05$ (p -values for significance relative to serum-starved controls).

0.5 pM or 1 ng/ml) whereas ACTH₃₉ shows a bell-shaped curve with a maximal stimulation of DNA synthesis between 0.1 and 1 nM. Based on these observations, 10^{−9} M ACTH₃₉ (Sigma) and bovine recombinant FGF2 1 ng/ml were added to rat primary cultures. Approximately 2 × 10⁴ G cells and F/R cells were seeded onto Thermanox™ Coverslips in DMEM with 10% FCS. After 24 h, the cell cultures (G and F/R) and the Y1 cell line were immersed and maintained, respectively, in DMEM/0.5% FCS for 24 h and in SFM for 48 h. Cells were treated for 2 h or 24 h with ACTH (10^{−9} M) or FGF2 (1 ng/ml) and then incubated with 100 μM of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), as described in Table 1. Cells were processed as described previously (Lotfi et al., 1997). Results of independent experiments were pooled and statistically analyzed using a χ^2 test with 1 d.f.

2.5. Analysis of ERK1/2 and cAMP response element binding (CREB protein) phosphorylation

Serum-starved cells, cultured in SFM for 48 h (Y1 cell line) or in DMEM/0.5% FCS for 24 h (G and F/R cells), were treated as indicated in the experiments. Cells were lysed in ice-cold RIPA buffer containing 50 mM of Tris–HCl (pH 7.5), 150 mM of NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitors (1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μg/ml of leupeptin, 2 μg/ml of aprotinin and 2 μg/ml of pepstatin) and phosphatase inhibitors (50 mM of sodium fluoride and 1 mM of sodium orthovanadate). Samples were clarified by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4 °C and quantified by Bradford assay. Subsequently, 150-μg aliquots of the total protein were resolved by 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was electroblotted onto Hybond-C nitrocellulose membranes. Using a semi-dry Bio-Rad apparatus, total ERK1/2 and CREB protein or Thr 203-Tyr 204-phosphorylated ERK1/2 and Ser 133-phosphorylated CREB protein were detected with monospecific rabbit polyclonal antibodies (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Chemiluminescent detection with secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit polyclonal antibodies (ECL-Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) followed. For inhibition of

MEK1 or PKA activity, cells were treated, respectively, with 10 μ M of UO126 (Promega, Madison, WI, USA) or 1 μ M of H-89 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 30 min before stimulation with ACTH or FGF2. Immunoblot results were quantitated by densitometric analysis using the Gel-Pro Imager and the quantification program Gel-Pro Imager kit-Version 1.0 for Windows. The results are representative of three independent experiments, in which Ponceau staining of the electroblotted membrane was used to monitor protein transfer and total protein loaded.

2.6. Immunocytochemistry for expression of aldosterone synthase cytochrome P-450, detection of phospho-ERK1/2 and nuclear localization of c-Fos protein

Approximately 2×10^4 cells were seeded onto Thermanox™ Coverslips (Nalge Nunc International) in DMEM with serum and fixed with formaldehyde 4% for 20 min for analysis of P450 aldosterone synthase (P450aldo) or then starved in either SFM for 48 h (Y1 cell line) or DMEM/0.5% FCS for 24 h (G and F/R cells). For inhibition of MEK1 or PKA activity, cells were serum arrested and treated, respectively, with 10 μ M of UO126 or 1 μ M of H-89 30 min before stimulation with ACTH or FGF2. For analysis of nuclear localization of c-Fos or phospho-ERK, cells were either untreated or treated for 2 h or 10 min, respectively, with ACTH, FGF2 or a combination of ACTH and FGF2. The specific antibody for rat P450aldo (anti-P450aldo), which was raised in rabbits, was kindly provided by Dr. Fumiko Mitani (Mitani et al., 1994), phospho-ERK1/2

(Cell Signaling Technology) or c-Fos immune complex (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were detected by immunoperoxidase staining using the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and diaminobenzidine as described previously (Lotfi and Armelin, 2001). The two coverslips per condition in each experiment were randomly coded and a blinded researcher counted the 500–600 nuclei per coverslip. Data from at least three independent experiments were obtained as a final value of the percentage of labeled nuclei under each condition and analyzed using an unpaired *t*-test.

3. Results

3.1. Specific expression of aldosterone synthase cytochrome P450 in G cells, but not in F/R cells

When G cells and F/R cells were immunostained with the affinity-purified anti-rat cytochrome P450aldo IgG, only G cells were positively stained (Fig. 1B). Strong and lightly positive staining appeared as fine granules in the cytoplasm, as well as around and upon the nuclei, of G cells, and approximately 2.8% of the cells presented no positive staining. The H&E staining (not shown) and counting of non-P450aldo-positive cells in G-cell culture showed that fasciculata cells accounted for

Fig. 1. Specific expression of aldosterone synthase cytochrome P450 (P450aldo) in rat adrenal primary culture. Glomerulosa (G) cells (A and B) and fasciculata/reticularis (F/R) cells (C and D) were obtained by sequential collagenase digestion/mechanical disaggregation and were maintained in DMEM/10% FCS for 24 h. After fixation with 3.7% formaldehyde, aldosterone synthase expression was revealed by an immunoperoxidase reaction using anti-rat cytochrome P450aldo IgG (Ogishima et al., 1992). (B and D) The antibody anti-P450aldo was used. In the control experiments A and C, normal rabbit serum was used in place of the specific antibody. These results are representative of two independent experiments. Magnification 400 $\times$.

approximately 1.5–3% to the total number of seeded adrenocortical cells. Our results are similar to those shown in isolated G cells by Hornsby et al. (1974) and Gallo-Payet et al. (1990). No positive staining was observed in the F/R cells (Fig. 1D). Neither was any positive staining seen in control experiments in which normal rabbit serum was used in place of the specific antibody (Fig. 1A and C, respectively, G cells and F/R cells).

3.2. Effects of ACTH and FGF2 on progression of cells from G1 to S phase: prolonged exposure to ACTH or short pulse does not promote cell cycle progression in normal adrenal cells

We found that, in serum-starved G cells, sustained (24 h), but not short pulse (2 h), treatment with FGF2 produced a two-fold increase in the percentage of nuclei labeled with BrdU (Table 1). In contrast, treatment with ACTH over the same time periods had an inhibitory effect on these cells. Irrespective of length of treat-

ment, serum-starved F/R cells showed no significant increase in BrdU incorporation with either FGF2 or ACTH treatment. The combination of ACTH and FGF2 had an antagonist effect, blocking S-phase entry in the Y1 cell line and in G cells. Whereas G cells, although not F/R cells, allow mitogenic stimulation by FGF2, normal adrenal cells in primary culture respond to ACTH with arrested cell cycle progression.

3.3. Similar viability of G cells and F/R cells were confirmed by vital dye exclusion assay

In order to determine whether the non-response of culture cells was attributable to a potentially traumatic procedure, such as primary disaggregation and cell separation culture, we measured the proportion of viable cells using dye viability exclusion assay with 4% Trypan Blue. We analyzed the viability of G cells and F/R cells after 3 days in serum-starvation (Table 2). After 3 days in culture, the differences between G cells and F/R cells

Fig. 2. Phosphorylation of ERK1/2 promoted by ACTH or FGF2 in adrenal cells in primary culture, glomerulosa (G) cells, fasciculata/reticularis (F/R) cells and cells in the Y1 adrenocortical tumor cell line. The cell line and cells in primary culture were maintained in serum-free medium (SFM) or DMEM/0.5% FCS for 48 h or 24 h, respectively, before stimulation. Some cells were not stimulated, and others were stimulated with ACTH or FGF2 for varying lengths of time (A). The relation between total ERK protein and the phosphorylation of ERK1/2 in cells treated with FGF2 was quantified through densitometry (B). The F/R cells were stimulated with ACTH or FGF2 and combination of ACTH and FGF2 for 10 min (C). Cellular lysates were assayed by Western blot using total or phospho-ERK1/2-specific antibodies. These results are representative of three independent experiments (A) and two independent experiments (C).

Table 2
Dye exclusion viability of rat adrenal primary culture

Cell type	Days after serum starvation	Viability (%)
G cells	1	88.6 ± 6.2
	2	86.1 ± 6.6
	3	85.9 ± 4.2
F/R cells	1	91.5 ± 2.4
	2	90.5 ± 3.9
	3	90.9 ± 2.9

Glomerulosa (G) cells and fasciculata/reticularis cells (F/R) cells were seeded in 24-well plates, maintained in DMEM/10% FCS for 24 h and subsequently serum-starved in DMEM/0.5% FCS for 3 days. On each day, a cell suspension from a well was mixed with 0.4% Trypan Blue and examined in a hemocytometer in order to count stained cells and total cells. Viability was calculated by the percentage of unstained cells. Results from three independent culture preparations were pooled such that 8–10 wells/cells were counted per day. The unpaired *t*-test showed that viability did not differ significantly.

were less than statistically significant, confirming the full viability of primary culture cells during this period.

3.4. Regulation of MAPK in adrenal cells—FGF2 is a strong activator of ERK1/2, whereas ACTH failed to stimulate this pathway in adrenal cells in primary culture

In order to analyze the effect of ACTH on the ERK1/2 pathways in adrenal cells in primary culture, G cells, F/R cells and cells in the Y1 cell line were maintained in 0.5% FCS for 24 h or in SFM for 48 h, respectively. Cells were pulsed with 1 nM of ACTH or 1 ng/ml FGF2 or both. The extracts were then prepared and assayed for phosphorylated or total forms of ERK1/2 by Western blot analysis (Fig. 2A). Although phosphorylated ERK1/2 is undetectable in untreated adrenal cells, treatment

with ACTH increases levels of phosphorylated ERK1/2 in the Y1 cell line but not in cells in primary culture. On the other hand, FGF2 promoted phosphorylation of ERK1/2 in Y1 cell line and rat adrenal cells in primary culture. The G and F/R cells extracts presented lower total ERK1/2 than did the Y1 cell line, although 150 µg aliquots of protein were loaded for all extracts, and efficient protein transfer was confirmed through Ponceau staining of electroblotted membranes. Taking the level of total ERK1/2 into account, phosphorylation of ERK1/2, as quantified by densitometry, was approximately five-fold higher in G cells than in F/R cells or in the Y1 cell line (Fig. 2B). The combination of ACTH and FGF2, at saturating concentrations, had no effect on ERK1/2 phosphorylation in Y1 cells (Lotfi et al., 2000). In contrast, in F/R cells (Fig. 2C) and G cells (not shown), ACTH antagonized the FGF2 effect, thereby inhibiting ERK1/2 activation by 30 and 50% in G cells and F/R cells, respectively.

3.5. Differences between the time course of ERK1/2 phosphorylation with FGF2 in the Y1 cell line and in adrenal cells in primary culture

The duration and strength of the ras/MAPK signal are critical variables that determine how cells interpret signals generated by different stimuli (Marshall, 1995). Therefore, we examined the time course of ERK1/2 phosphorylation in response to FGF2 stimulation in the Y1 cell line, as well as in G and F/R cells. As shown in Fig. 3, the pattern of ERK1/2 stimulation in the Y1 cell line differed from that seen in cells in primary culture. At 10 min, ERK1/2 phosphorylation stimulated by FGF2 was detected in G and F/R cells, and after 30 min of stimulation, protein phosphorylation declined in both cell types (Fig. 3A). In contrast, FGF2 stimulated sustained phosphorylation of ERK1/2 in the Y1 cell line (Fig. 3B); substantial levels of the phosphorylated forms of

Fig. 3. Time-course of ERK1/2 phosphorylation promoted by FGF2 in adrenal cells in primary culture (A), glomerulosa (G) cells, fasciculata/reticularis (F/R) cells and cells in the Y1 adrenocortical tumor cell line (B). The cell line and cells in primary culture were maintained in serum-free medium (SFM) or DMEM/0.5% FCS for 48 h or 24 h, respectively, before stimulation. Cells were not stimulated or were stimulated with 5 ng/ml of FGF2 for different lengths of time. Cellular lysates were assayed by Western blot using phospho-ERK1/2-specific antibody. These results are representative of three independent experiments.

Fig. 4. Expression of phospho-ERK1/2 by immunocytochemistry in glomerulosa (G) cells (A and B) and fasciculata/reticularis (F/R) cells (C and D) treated for 10 min with 1 ng/ml of FGF (A and C), or untreated (B and D). After fixation with 3.7% formaldehyde, phospho-ERK1/2 expression was revealed by an immunoperoxidase reaction using phospho-ERK1/2-specific antibody. (A) The arrow indicates diffuse cytoplasm and nuclear labeling, (C) the arrowhead indicates nuclear labeling. These results are representative of three independent experiments. Magnification 400 $\times$. Arrowheads indicate nuclear staining.

p42 and p44 were constant up to 3 h. In order to determine the subcellular localization of phospho-ERK1/2 in cells in primary culture, we utilized immunocytochemistry assay (Fig. 4). The F/R cells displayed nuclear labeling of 54% of cells after 10 min of FGF2 treatment (Fig. 4C). With the same treatment, 90% of the positively labeled G cells (Fig. 4A) presented phosphorylated forms of ERK distributed throughout the cytoplasm and nucleus. As presented in Fig. 4B and D, respectively, G and F/R cells in primary culture showed no phosphorylated forms in untreated cells. The FGF2 stimulated sustained ERK1/2 phosphorylation in the Y1 cell line, in contrast with the transient activation seen in adrenal cells in primary culture.

3.6. CREB protein phosphorylation isoform mediates the response of ACTH and FGF2 in rat adrenal cells in primary culture

To test the integrity of responses initiated in the ACTH receptors of cells isolated from rat adrenal glands, cells in primary culture were incubated with ACTH (1 nM) for 10 min. Cell extracts were then fractionated and immunoblotted with an antibody that specifically recognizes the CREB protein

isoform only when phosphorylated at Ser-133 (phospho-CREB protein), as shown in Fig. 5. In addition to CREB protein at Ser 133, this antibody also recognizes another CREB-related protein, the ATF-1 isoform. Phosphorylated forms of CREB protein are weakly detectable in the G₀/G₁-arrested Y1 cell line and in G cells maintained in DMEM/0.5% FCS. Under the same conditions, F/R cells presented a more pronounced band of phospho-CREB protein than did G cells. Both ACTH and 8-bromo-cAMP stimulated phosphorylation/activation of CREB protein forms in all of the cell types studied. However, in the Y1 cell line, we also identified the phosphorylated form of the CREB-related protein ATF-1. On the other hand, FGF2 stimulated phospho-CREB protein efficiently in cells in primary culture. In the Y1 cell line, FGF2 showed a faint band of ATF-1 but no CREB protein phosphorylation. Analysis of interaction between ACTH and FGF2 in cells in primary culture revealed that FGF2 did not antagonize the ACTH-induced CREB protein phosphorylation, whereas the combination of ACTH and FGF2 increased CREB protein and ATF-1 phosphorylation in the Y1 cell line. We examined the time course of CREB protein phosphorylation in response to ACTH stimulation in F/R cells. Stimulation with 1 nM of ACTH resulted in transient

Fig. 5. Phosphorylation of CREB protein promoted by ACTH and/or FGF2 or 8-bromo-AMP in primary culture of adrenal cells, glomerulosa (G) cells, fasciculata/reticularis (F/R) cells and cells in the Y1 adrenocortical cell line. (A) The Y1 cell line and cells in primary culture were maintained in serum-free medium (SFM) or DMEM/0.5% FCS for 48 h or 24 h, respectively. Cells were unstimulated or were stimulated with ACTH, FGF2 or 8-bromo-cAMP for 10 min. (B) Quantitative analysis of phospho-CREB protein. (C) F/R cells were stimulated with ACTH (1 nM) for varying treatment times. Cellular lysates were assayed by Western blot using total CREB protein or phospho-CREB-specific antibodies. (A) One hundred and fifty micrograms of total protein was loaded, and 100 μ g of total protein was loaded in (B). These results are representative of three (A) and two (B) independent experiments.

protein activation with maximum phosphorylation after 1 h of stimulation, declining to near basal levels after 3 h (Fig. 5B).

3.7. PKA is involved in CREB protein phosphorylation by FGF2 in adrenal cells in primary culture

Given that FGF2 activates CREB protein in normal adrenal cells (Fig. 5), we decided to test the effect of the MEK1/2 inhibitor UO126 and the PKA inhibitor H-89 on the FGF2-induced phospho-CREB protein increases in G and F/R cells (Fig. 6). Cytotoxic potential was analyzed by determining total ERK protein in F/R cells and in the Y1 cell line treated with different concentrations of the inhibitors. We observed no differences between control cells and those treated with the inhibitors (data not shown). At 10 μ M, UO126 fully inhibited FGF2-promoted CREB protein phosphorylation in F/R cells, whereas 1 μ M of H-89, a selective and potent inhibitor of PKA activity, partially inhibited FGF2-induced CREB protein phosphorylation in both adrenal cell types in primary culture. These results indicate cross talk between the MAPK cascade and the PKA signaling pathway, integrating different signals in the adrenal cells stimulated by FGF2.

3.8. ACTH and FGF2 induce c-Fos protein with differing kinetics and intensity in normal adrenal cells

In the Y1 cell line, c-Fos induction has been taken as a molecular sensor of signals initiated in ACTH or FGF2 (Lotfi and Armelin, 2001). In the present study, in contrast with the results of ERK1/2 phosphorylation and DNA synthesis by ACTH, 2 h of ACTH pulses applied to adrenal cells in primary culture efficiently induced c-Fos protein (Figs. 7 and 8C). There was no c-Fos detected in 24-h serum-starved cells (Fig. 8A), but c-Fos accumulated with varying intensity after treatment with FGF2 and ACTH (Figs. 7A and B and 8B and C, respectively). The ACTH causes c-Fos to accumulate with similar time course in both cellular types. However, in F/R cells, the ACTH effect on c-Fos accumulation was sustained efficiently over 6-h, whereas the FGF2 effect was transient and declined after 2 h (Fig. 7B). After 2 h, c-Fos was detected in at least 80 and 70%, respectively, of the nuclei of ACTH-treated G and F/R cells. In contrast, the effect of FGF2 on accumulated c-Fos was about 40 and 50% in G and F/R cells, respectively (Fig. 7A and B). As determined in unpaired *t*-tests, the differences between c-Fos percentages obtained with ACTH and FGF2 treatments (except for that at

Fig. 6. Phosphorylation of CREB protein promoted by ACTH, FGF2 or 8-bromo-cAMP in adrenal cells in primary culture, glomerulosa (G) cells, fasciculata/reticularis (F/R) cells and cells in the Y1 adrenocortical cell line, as well as inhibition by PKA and MEK1/2 inhibitors. (A) The cell line and cells in primary culture were maintained for 48 h in serum-free medium (SFM) and 24 h in DMEM/0.5% FCS, respectively. Serum-starved primary culture cells and cells in the Y1 cell line were untreated or were pretreated for 30 min with PKA and MEK1/2 inhibitors (H-89 and UO126, respectively) and either unstimulated or stimulated with ACTH, FGF2 or 8-bromo-cAMP for 10 min. (B) Quantitative analysis of phospho-CREB protein. Cellular lysates were assayed by Western blot using total CREB protein or phospho-CREB-specific antibodies. These results are representative of three independent experiments.

1 h in F/R cells) were statistically significant regardless of the cell type analyzed (ACTH versus FGF2 in G cells: $p < 0.04$ for 0.5 h, $p < 0.001$ for 1 and 2 h, $p < 0.012$ for 4 h, and $p < 0.02$ for 6 h; ACTH versus FGF2 in F/R cells: $p < 0.01$ for 0.5 and 2 h, $p < 0.001$ for 4 and 6 h). The combination of ACTH and FGF2 promoted maximal induction of c-Fos (Figs. 7C and 8D) in both cell types, with no significant differences between G and F/R cells percentages.

3.9. The PKA pathway is not the only route by which ACTH stimulates c-Fos protein in normal rat adrenal cells

To investigate the pathway by which ACTH and FGF2 regulate c-Fos protein in adrenal cells in primary culture, we used MEK1/2 and PKA inhibitors (UO126 and H-89, respectively) (Fig. 9). As expected, the inhibitor of the ERK1/2 pathway did not regulate c-Fos protein in G and F/R cells treated with ACTH. In contrast, UO126 and H-89 strongly inhibited c-Fos induction by FGF2 in G and F/R cells, whereas H-89 produced significant inhibition ($p < 0.001$) of c-Fos induction by ACTH only in G cells. These results imply that the PKA and MEK1/2 pathways mediate c-Fos induction by FGF2 and that inhibition of the PKA pathway is insufficient to suppress c-Fos stimulated by

ACTH, suggesting that c-Fos protein is regulated through a route or routes other than the PKA pathway. The c-Fos induction had no apparent effect of the H-89 inhibitor in F/R cells treated with the combination of ACTH and FGF2. In contrast, UO126 significantly ($p < 0.0002$) increased the number of c-Fos labeled nuclei, suggesting that, in F/R cells treated with the ACTH-FGF2 combination, the ERK1/2 activation is inhibitory to c-Fos induction. These observations reinforce the assumption that the FGF2 and ACTH mechanisms of action are highly complex.

4. Discussion

It has been observed that ACTH administered to Y1 cells as a short pulse early in the G1 phase of the cell cycle promotes the progression of cells from G1 phase to S phase (Lotfi et al., 1997). The similarity between this effect and that of FGF2 prompted us to examine the effects of ACTH and FGF2 on rat adrenal cells in primary culture. In agreement with the proposal that ACTH is not a direct mitogen (Hornsby, 1985), we found that ACTH does not act as a mitogenic agent in rat glomerulosa and fasciculata/reticularis cells. In contrast to the Y1 cell line, ACTH does not resemble FGF2 in normal adrenal cells. In fact, 24-h FGF2 is mitogenic only in G cells. In normal adult

Fig. 7. Immunocytochemistry assay showing the kinetics of nuclear localization of c-Fos protein induced by 1 nM of ACTH or 1 ng/ml of FGF2 or both in glomerulosa (G) cells and fasciculata/reticularis (F/R) cells. Serum-starved cells in primary culture were treated with 1 nM of ACTH or 1 ng/ml of FGF or both, and c-Fos protein was assayed by immunocytochemistry as previously described (Lotfi et al., 1997). Subsequently, nuclear c-Fos immune complex was detected by immunoperoxidase staining using the Vectastain Elite ABC kit and diaminobenzidine. Percentages of c-Fos-labeled nuclei from three independent experiments were pooled and analyzed using unpaired *t*-tests. The differences between G and F/R cell c-Fos values with ACTH or FGF2 treatments, except for that at 1 h in F/R cells, were statistically significant, regardless of the cell types analyzed (A) ACTH vs. FGF2 in G cells: * $p < 0.04$ for 0.5 h; * $p < 0.001$ for 1 and 2 h; ** $p < 0.012$ for 4 h; # $p < 0.02$ for 6 h. (B) ACTH vs. FGF2 in F/R cells: ** $p < 0.01$ for 0.5 h and 2 h; * $p < 0.001$ for 4 and 6 h). The combination of ACTH and FGF2 promoted maximal induction of c-Fos (Fig. 7C) in both cell types, with no significant differences between G and F/R cell percentages.

rat adrenals, mitotic activity is greater in the outer part of gland, mainly in the zona glomerulosa and perhaps the outer fasciculata (Ho and Vinson, 1997; Vinson, 2003). Cell proliferation within the glomerulosa is promoted by many agents, including

growth factors (Vinson, 2004). Therefore, our results demonstrating the proliferative effects of FGF2 on G cells strengthens the hypothesis that the zona glomerulosa is the primary site of cell division promoted by growth factors. Basic FGF-binding sites have been detected in the capsule of rat adrenal cortex and zona glomerulosa (Basile and Holzwarth, 1994), suggesting that the connective tissue is a source of growth-promoting factors. Bicknell (2001) described another possible mechanism of proliferative control for adrenal cells. The author reported that the pro- γ -MSH processed by a specific serine protease expressed in adrenal cells produces a new peptide that is mitogenic for adrenocortical cells.

In isolated normal adrenocortical cells, ACTH does not activate the ERK pathway but does interfere in the FGF2-induced ERK phosphorylation. The fact that the FGF2-induced ERK phosphorylation detected was stronger in the G cells than in the F/R cells suggests that it could be important to the S entry in the G cells. The ACTH activation of ERK1/2 in the Y1 cell line suggests certain signaling permissiveness that is probably related to elevated c-Ki-ras-GTP expression, which is, in turn, responsible for the malignant phenotype displayed by the Y1 cell line (Schwab et al., 1983; Kimura and Armelin, 1988). In view of these properties, some interpretations of Y1 cell line phenomena should be considered. We found a marked difference between the FGF2-induced phosphorylation of the ERK1/2 pathway seen in the Y1 cell line and that observed in F/R cells, the former being sustained and the latter evanescent. It has been well documented that the strength and duration of signal pathway activation can have profound effects on the biological response of cells (Marshall, 1995).

In spite of the lower levels of total ERK in primary cultures, FGF2 efficiently activated ERK1/2 in adrenal cells in primary culture with different subcellular localization in G and F/R cells. Nucleocytoplasmic localization of MAPK is a pivotal factor in the regulation of its downstream targets, including those involved in differentiation, cell function and growth control (Pouyssegur et al., 2002; Smith et al., 2004). Structural analysis studies have indicated that only part of the active MAPK pool translocates to the nucleus, and much remains in the cytoplasm and other subcellular compartments (Ferrel, 1998; Pearson et al., 2001). Our results regarding subcellular localization in normal adrenal cells suggest that there are functionally distinct populations of MAPK activated by FGF2, which may restrict potential targets in rat F/R cells and G cells. This may occur through highly specialized complexes, concentration of a MAPK at a site of action, or compartmentalization of a population of a MAPK to a diffusion-limited site such as the nucleus (Pearson et al., 2001).

We were able to measure the permissive effect of the Y1 cell line by comparing Y1 cell line c-Fos induction to that observed in primary cultures treated with FGF2. We reported that the maximum accumulation of c-Fos is at least 80% and sustained over 6 h in Y1 cell line treated with FGF2. In the adrenal cells in primary culture, G and F/R cells, the same treatment results in transiently 40–60% of c-Fos labeled nuclei, respectively (Fig. 6). As previously shown by Lotfi et al. (1997) and Lotfi and Armelin (2001), pulses of FGF2 stimulate the entry of G_0 -arrested Y1

Fig. 8. Immunocytochemistry assay showing nuclear localization of c-Fos protein in untreated fasciculata/reticularis (F/R) cells (A) and in F/R cells treated for 2 h with 1 ng/ml of FGF2 (B), 1 nM of ACTH (C) or both ACTH and FGF2 (D). Serum-starved cells in primary culture were treated with 1 nM of ACTH or 1 ng/ml of FGF2 or both, and c-Fos protein was assayed by immunocytochemistry as previously described (Lotfi et al., 1997). Subsequently, nuclear c-Fos immune complex was detected by immunoperoxidase staining using the Vectastain Elite ABC kit and diaminobenzidine. These results are representative of three independent experiments. Magnification 400 $\times$.

cells into S phase, resembling the effect of fetal bovine serum. In G cells, the proliferative effect of FGF2, when compared with untreated cells, is observed only after prolonged FGF2 exposure.

Although ACTH did not affect the ERK pathway in either G or F/R cells, it induced a marked increase in CREB protein phosphorylation, indicating efficient transduction of signals initiated in the ACTH/ACTH-R of adrenal cells in primary culture. Multiple signaling pathways converge at the level of the CREB protein, a transcriptional factor that regulates expression of CRE-containing genes. Three proteins that bind the CRE and are phosphorylated by PKA have been identified: CREB, CREM and ATF-1 (Meyer and Habener, 1993). Whereas CREB and ATF-1 proteins stimulate transcription, some isoforms of CREM can downregulate CRE activity. The present study shows that, in both G and F/R cells, the CREB protein isoform is effectively the only CRE-related protein target of ACTH and FGF2. The blockage of the MAPK and PKA pathways by specific inhibitors showed that both pathways are required for CREB protein phosphorylation by FGF2 in rat adrenal cells in primary culture. In contrast, only the PKA pathway is required for activa-

tion of CREB protein in cells stimulated by ACTH. Our results suggest probable cross talk between MAPK cascade and the PKA pathway, integrating various adrenal cell signals stimulated by FGF2. The binding of FGF2 to the tyrosine kinase class of membrane receptors induces the sequential activation of Raf-1 kinase, MEK, and ERK (Pearson et al., 2001). Although signaling through Raf-1 occurs exclusively through the serum response elements, FGF2 can also activate a region of the pip92 promoter that contains a CREB protein binding site near the site of transcription initiation (Chung et al., 1998). Our results suggest that CRE-mediated gene transcription appears to be important during the FGF2-induced mitogenic response of glomerulosa cells but is impaired in the Y1 cell line. In the Y1 cell line, the CREB protein family was altered, with decreased CREB protein expression and compensatory overexpression of ATF-1, as has been described in the human adrenocortical cancer cell line H295R by Groussin et al. (2000). Since normal adrenal cells express high levels of CREB protein and no ATF-1, this drop in CREB protein expression and overexpression of ATF-1 could be linked to cellular transformation of the Y1 cell line. It was observed that

Fig. 9. Immunocytochemistry assays of glomerulosa (G) cells and fasciculata/reticularis (F/R) cells, showing ACTH and FGF2 induction of c-Fos protein and inhibition by PKA (H-89) and MEK1/2 inhibitors (UO126) in (A) G cells and (B) F/R cells. G_0/G_1 -arrested cells in primary culture were untreated or were pretreated (–30 min) with PKA and MEK1/2 inhibitors and unstimulated or stimulated with 1 nM of ACTH or 1 ng/ml of FGF2 or both for 2 h. The nuclear localization of c-Fos was assayed by immunoperoxidase as previously described in Fig. 7. Percentages of c-Fos-labeled nuclei from two independent experiments were pooled, and approximately 2000 cells were counted per condition. Statistical significance was determined using unpaired *t*-test for statistical analysis of all differences among group means. * $p < 0.001$; ** $p < 0.0001$; *** $p < 0.0002$; # $p < 0.005$; ## $p < 0.002$.

CREB protein levels were lower in malignant adrenocortical carcinoma than in adrenal benign adenoma or in the normal adrenal cortex (Rosenberg et al., 2003). In addition, overexpression of CREB and ATF-1 has been observed in CREB protein knock-out mice models, suggesting compensatory mechanisms among members of the CREB/CREM/ATF-1 family in some endocrine tissues (Rosenberg et al., 2002).

In the present study, ACTH was found to stimulate rapid accumulation of c-Fos in adrenal cells in primary culture, resembling the time course of c-Fos induction described in the Y1 cell line. In contrast, this effect in primary culture is likely mediated by activation of the PKA pathway rather than of the MAPK-signaling cascade (Lotfi et al., 2000). However, the ability of the PKA inhibitor to partially inhibit c-Fos protein in normal adrenal cells treated with ACTH suggests that there are other routes of c-Fos induction, such as PKC or CaMKII (Gallo-Payet and Payet, 2003). In addition, although we found that ACTH did not activate ERK1/2, it efficiently activated c-Fos protein

in adrenal cells. Therefore, the event responsible for the non-mitogenic effect of ACTH on cells in primary culture probably occurs after induction of c-Fos.

The observation that FGF2 stimulation of ERK1/2 phosphorylation and c-Fos accumulation is transient suggests the presence of PKA pathway-regulated factors that control the stability of both signals. Such factors could play important roles in mitogenic signaling in adrenal cells in primary culture. The results presented herein demonstrate that there are distinct differences between ACTH and FGF2 signaling mechanisms in adrenal cells in primary culture.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and from the Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo to C.F.P.L. (G.E.M. is recipient of scientific initiation fellowships from FAPESP). We thank Prof. A.G. Gambarini (Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP) for generously providing the bovine recombinant FGF2. The anti-rat P450aldo antibody was a gift from Dr. F. Mitani (School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan).

References

- Basile, D.P., Holzwarth, M.A., 1994. Basic fibroblast growth factor receptor in the rat adrenal cortex: effects of suramin and unilateral adrenalectomy on receptor numbers. *Endocrinology* 134, 2482–2489.
- Bicknell, A.B., Lomthaisong, K., Wodds, R.J., Hutchinson, E.G., Bennett, H.P., Gladwell, R.T., Lowry, P.J., 2001. Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. *Cell* 105, 903–912.
- Chung, K.-C., Gomes, I., Wang, D., Lau, L.F., Rosner, M.R., 1998. Raf and fibroblast growth factor phosphorylate Elk1 and activate the serum response element of immediate early gene *pip92* by mitogen-activated protein kinase-independent as well as -dependent signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2272–2281.
- Ferrel Jr., J.E., 1998. How regulated protein translocation can produce switch-like responses. *Trends Biochem. Sci.* 23, 461–465.
- Forti, F.L., Schwindt, T.T., Moraes, M.S., Eichler, C.B., Armelin, H.A., 2002. ACTH promotion of p27Kip induction in mouse Y1 adrenocortical tumor cells is dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation. *Biochemistry* 41, 10133–10140.
- Gallo-Payet, N., Payet, M.D., 2003. Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc. Res. Tech.* 61, 275–287.
- Gallo-Payet, N., Chouinard, L., Balestre, M.N., Guillon, G., 1990. Dual effects of dopamine in rat adrenal glomerulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 1100–1108.
- Groussin, L., Massias, J.F., Bertagna, X., Bertherat, J., 2000. Loss of expression of the ubiquitous transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB protein) and compensatory overexpression of the activator CREMγ in the human adrenocortical cancer cell line H295R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 345–354.
- Haning, R., Tait, S.A.S., Tait, J.F., 1970. In vitro effects of ACTH, angiotensins, serotonin and potassium on steroid output and conversion of corticosterone to aldosterone by isolated adrenal cells. *Endocrinology* 87, 1147–1167.
- Ho, M.M., Vinson, G.P., 1997. Peptides growth factors and the adrenal cortex. *Microsc. Res. Tech.* 36, 558–568.
- Hornsby, P.J., O'Hare, M.J., Neville, A.M., 1974. Functional and morphological observations on rat adrenal zona glomerulosa cells in monolayer culture. *Endocrinology* 95, 1240–1251.

- Hornsby, P.J., 1985. Regulation of adrenocortical cell proliferation in culture. *Endocr. Res.* 10, 259–281.
- Kimura, E., Armelin, H.A., 1988. Role of proto-oncogene c-Ki-ras amplification and overexpression in the malignancy of Y-1 adrenocortical tumor cells. *Braz. J. Biol. Res.* 21, 189–201.
- Kimura, E., Sonobe, M.H., Armelin, M.C.S., Armelin, H.A., 1993. Induction of FOS and JUN proteins by adrenocorticotropin and phorbol ester but not by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate derivatives. *Mol. Endocrinol.* 7, 1463–1471.
- Lepique, A.P., Forti, F.L., Moraes, M.S., Armelin, H.A., 2000. Signal transduction in G₀/G₁-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. *Endocr. Res.* 26, 825–832.
- Lepique, A.P., Moraes, M.S., Rocha, K.M., Eichler, C.B., Hajj, G.N.M., Schwindt, T.T., Armelin, H.A., 2004. c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. *J. Mol. Endocr.* 33, 623–638.
- Lotfi, C.F.P., Armelin, H.A., 2001. cFos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *J. Endocr.* 168, 381–389.
- Lotfi, C.F.P., Costa, E.T., Schwindt, T.T., Armelin, H.A., 2000. Role of ERK/MAP Kinase in mitogenic interaction between ACTH and FGF2 in mouse Y-1 adrenocortical tumor cells. *Endocr. Res.* 26, 873–877.
- Lotfi, C.F.P., Todorovic, Z., Armelin, H.A., Schimmer, B.P., 1997. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y-1 mouse adrenocortical tumor cells. *J. Biol. Chem.* 272, 29886–29891.
- Marshall, C.J., 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179–185.
- Meyer, T.E., Habener, J.F., 1993. Cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr. Rev.* 14, 269–290.
- Mitani, F., Suzuki, H., Hata, J., Ogishima, T., Shimada, H., Ishimura, Y., 1994. A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. *Endocrinology* 135, 431–438.
- Ogishima, T., Suzuki, H., Hata, J., Mitani, F., Ishimura, Y., 1992. Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 β in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology* 130, 2971–2977.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T.B., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H., 2001. Mitogenic-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153–183.
- Pouyssegur, J., Volmar, V., Lenormand, P., 2002. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signaling. *Biochem. Pharmacol.* 64, 755–763.
- Rocha, K.M., Forti, F.L., Lepique, A.P., Armelin, H.A., 2003. Deconstructing the molecular mechanisms of cell cycle control in a mouse adrenocortical cell line: roles of ACTH. *Microsc. Res. Tech.* 61, 268–274.
- Rosenberg, D., Groussin, L., Jullian, E., Perlemoine, K., Bertagna, X., Bertherat, J., 2002. Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 968, 65–74.
- Rosenberg, D., Groussin, L., Jullian, E., Perlemoine, K., Medjane, S., Louvel, A., Bertagna, X., Bertherat, J., 2003. Transcription factor 3',5'-cyclic Adenosine 5'-monophosphate-responsive element-binding protein (CREB) is decreased during human adrenal cortex tumorigenesis and fetal development. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 88, 3958–3965.
- Schwab, M., Alitalo, K., Varmus, H.E., Bishop, M., George, D., 1983. A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumor cells. *Nature* 303, 497–501.
- Schwindt, T.T., Forti, F.L., Juliano, M.A., Juliano, L., Armelin, H.A., 2003. Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. *Biochemistry* 42, 2116–2121.
- Smith, E.R., Smedberg, J.L., Rula, M.E., Xu, X., 2004. Regulation of Ras-MAPK pathway mitogenic activity by restricting nuclear entry of activated MAPK in endoderm differentiation of embryonic carcinoma and stem cells. *J. Cell Biol.* 164, 689–699.
- Vinson, G.P., 2003. Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc. Res. Tech.* 61, 227–239.
- Vinson, G.P., 2004. Glomerulosa function and aldosterone synthesis in the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 217, 59–65.
- Yasumura, Y., Buonassisi, Y., Sato, G., 1966. Clonal analysis of differentiated function in animal cell culture. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res.* 26, 529–535.

ANEXOS

ANEXO B – Almeida et al., 2008.

Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2008 Sep;93(9):3524-31

Expression of Insulin-Like Growth Factor-II and Its Receptor in Pediatric and Adult Adrenocortical Tumors

Madson Q. Almeida, Maria Candida Barisson Villares Fragoso, Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, Mariza Gerdulo Santos, Mirian Yumie Nishi, Marcia Helena Soares Costa, Antonio Marcondes Lerario, Carolina Canton Maciel, Gabriele Ebling Mattos, Alexander Augusto Lima Jorge, Berenice B. Mendonca, and Ana Claudia Latronico

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (M.Q.A., M.C.B.V.F., M.G.S., M.Y.N., M.H.S.C., A.M.L., A.A.L.J., B.B.M., A.C.L.), Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, and Laboratório de Estrutura e Função Celular (C.F.P.L., C.C.M., G.E.M.), Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, Brazil

Background: Adrenocortical tumors are heterogeneous neoplasms with incompletely understood pathogenesis. IGF-II overexpression has been consistently demonstrated in adult adrenocortical carcinomas.

Objectives: The objective of the study was to analyze expression of *IGF-II* and its receptor (*IGF-IR*) in pediatric and adult adrenocortical tumors and the effects of a selective IGF-IR kinase inhibitor (NVP-AEW541) on adrenocortical tumor cells.

Patients: Fifty-seven adrenocortical tumors (37 adenomas and 20 carcinomas) from 23 children and 34 adults were studied.

Methods: Gene expression was determined by quantitative real-time PCR. Cell proliferation and apoptosis were analyzed in NCI H295 cells and a new cell line established from a pediatric adrenocortical adenoma.

Results: IGF-II transcripts were overexpressed in both pediatric adrenocortical carcinomas and adenomas. Otherwise, *IGF-II* was mainly overexpressed in adult adrenocortical carcinomas (270.5 ± 130.2 vs. 16.1 ± 13.3 ; $P = 0.0001$). *IGF-IR* expression was significantly higher in pediatric adrenocortical carcinomas than adenomas (9.1 ± 3.1 vs. 2.6 ± 0.3 ; $P = 0.0001$), whereas its expression was similar in adult adrenocortical carcinomas and adenomas. *IGF-IR* expression was a predictor of metastases in pediatric adrenocortical tumors in univariate analysis (hazard ratio 1.84; 95% confidence interval 1.28–2.66; $P = 0.01$). Furthermore, NVP-AEW541 blocked cell proliferation in a dose- and time-dependent manner in both cell lines through a significant increase of apoptosis.

Conclusion: *IGF-IR* overexpression was a biomarker of pediatric adrenocortical carcinomas. Additionally, a selective IGF-IR kinase inhibitor had antitumor effects in adult and pediatric adrenocortical tumor cell lines, suggesting that IGF-IR inhibitors represent a promising therapy for human adrenocortical carcinoma. (*J Clin Endocrinol Metab* 93: 3524–3531, 2008)

Adrenocortical carcinomas account for only 0.05–0.2% of all cancers, with an estimated incidence of 0.5–2 per million per year in adults (1–4). Nevertheless, a remarkably high

annual incidence of adrenocortical tumors has been reported in children younger than 15 yr from southern Brazil, where a high frequency of a germline mutation (Arg337His) of the P53 tumor

0021-972X/08/\$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2008-0065 Received January 10, 2008. Accepted June 27, 2008.

First Published Online July 8, 2008

Abbreviations: CI, Confidence interval; C_T, cycle threshold; FBS, fetal bovine serum; HR, hazard ratio; IGF-IR, IGF-I receptor; RLU, relative light unit.

suppressor gene has been reported (5–7). Differently from adults, pediatric adrenocortical tumors with apparently poor prognosis based on the histopathological features often have a better clinical outcome (8, 9). To date, there are limited data to define histological or molecular markers that can reliably distinguish benign from malignant adrenocortical tumors, mainly in pediatric patients (10).

The molecular pathogenesis of adrenocortical tumors is still poorly understood. The IGF system has an essential role in normal adrenocortical cell growth and development (11, 12). In a series of comprehensive studies, Gicquel *et al.* (13–15) demonstrated that structural rearrangement of the 11p15 locus, typically uniparental paternal isodisomy, and *IGF-II* overexpression were found in the great majority of adult sporadic adrenocortical carcinomas. IGF-II exerts its mitogenic effects through interaction with IGF-I receptor (IGF-IR) (16). Thus, overexpression of IGF-II and/or IGF-IR may trigger a cascade of molecular events that can ultimately lead to malignancy (17). However, the role of IGF-IR in adult and pediatric adrenocortical tumorigenesis remains to be determined.

Cytotoxic chemotherapy has been extensively used for metastatic adrenocortical carcinoma, although response rates are generally poor (3, 18, 19). The overall response rate of the Berruti protocol (mitotane with etoposide, doxorubicin, and cisplatin) was 49%, including mainly partial responses (19). Therefore, it

is clear that current treatment protocols are not effective and that new therapies are strongly needed (20). Two microarray studies identified that up-regulation of *IGF-II* expression was the dominant change in malignant adrenocortical tumors (21, 22). Consequently, IGF-IR inhibition has been proposed as the most appropriated target for adrenocortical carcinoma treatment (16, 20, 23). Recently IGF-IR kinase inhibitors have been considered a new therapeutic approach for hematologic and solid malignancies (17, 23–25). A selective IGF-IR kinase inhibitor (NVP-AEW541) was capable of effectively inhibiting ligand-mediated IGF-IR autophosphorylation as well as protein kinase B and MAPK phosphorylation (24).

In this study, we investigated *IGF-II* and *IGF-IR* expression in pediatric and adult adrenocortical tumors. In addition, the effects of the NVP-AEW541 on proliferation and apoptosis were analyzed in NCI H295 cells and a new cell line that was established from a pediatric adrenocortical adenoma of our cohort.

Patients and Methods

The study was approved by the Ethics Committee of Hospital das Clinicas, Sao Paulo, Brazil, and informed written consent was obtained from all patients and/or parents. The clinical and histopathological features of children and adults with adrenocortical tumors are

FIG. 1. Expression of *IGF-II* (A and B) and *IGF-IR* (C and D) in 57 sporadic adrenocortical tumors (23 children and 34 adults) using quantitative real-time PCR. Y axis shows fold increase in *IGF-II* and *IGF-IR* expression of tumor samples relative to the mean *IGF-II* and *IGF-IR* expression levels of a pool of normal adrenals. The horizontal line within the box plot represents the median value, the box plot limits refer to 25th to 75th percentiles, and the box plot bars includes the 10th to 90th percentiles for mRNA levels.

summarized in supplemental Tables 1 and 2, respectively, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online Web site at <http://jcem.endojournals.org>. Samples of sporadic adrenocortical tumors were obtained from 23 children (16 girls and 7 boys; 0.9–15 yr) and 34 adult patients (29 women and 5 men; 18–66 yr). The mean follow-up period was 57.8 ± 6.2 months. In the pediatric group, we observed that seven of 13 tumors with Weiss score of at least 4 had benign evolution, confirming that this isolated criterion is not reliable for children's tumor classification (9). Consequently, the diagnosis of malignancy in this group was established in six of 23 pediatric adrenocortical tumors by an advanced tumor stage (III or IV) and/or poor clinical outcome. Adult adrenocortical tumors were classified according to Weiss criteria: 20 adrenocortical adenomas (Weiss score ≤ 3) and 14 carcinomas (Weiss score ≥ 4) (26). The p53 tumor suppressor gene was previously studied in 22 children and 26 adults, and the known Arg337His mutation was identified in 77 and 12% of them, respectively (7, 27).

Quantitative real-time PCR

After surgical resection, tumor fragments were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA extraction using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA was generated from 1 μg of total RNA using the high capacity kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative real-time PCR was performed in the ABI Prism 7700 sequence detector using TaqMan gene expression assays for the gene quantification according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The assay IDs were: IGF-II, Hs01005963_m1; IGF-IR, Hs00181385_m1; β -actin, 43263; 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase type II (*HSD3B2*) Hs00605123_m1; 11- β -hydroxylase (*CYP11B1*) Hs01596404_m1; 21-hydroxylase (*CYP21A2*) Hs00416901_g1. A cycle threshold (C_T) value in the linear range of amplification was selected for each sample in triplicate and normalized to β -actin expression levels. The relative expression levels were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, where the $\Delta\Delta C_T$ is the difference between the selected ΔC_T value of a particular sample and the ΔC_T of a pool of 61 normal adrenals from autopsies (CLONTECH, Palo Alto, CA) (28). The mean expression of the target genes in the pool of normal adrenals was assigned an expression value of 1.0, and fold increase in the expression levels was determined for each tumor sample and adrenocortical tumors cell lines.

Adrenocortical cell lines

The NCI H295 cell line, previously established from an invasive primary adrenocortical carcinoma, was kindly provided by Dr. Walter L. Miller (University of California, San Francisco, CA) (29). A new pediatric transitory cell line was obtained from a functioning adrenocortical adenoma (weight 10 g; stage I) diagnosed in a 1.1-yr-old girl with mixed syndrome (virilization and Cushing syndrome) (patient 15; supplemental Table 1). The tumor fragments (0.67 g), obtained from viable nonhemorrhagic areas, were digested by sequential 4 mg/ml collagenase plus 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ deoxyribonuclease I (Life Technologies, Inc., Paisley, UK), 30 min digestion and mechanical disaggregated with gentle movements in a volumetric pipette. The digested material was then filtered in a 100- μm nylon filter to retain nondigested material and thereafter pelleted at 700 rpm for 10 min. Two media were used: DMEM and reduced serum medium modification of MEM (Opti-MEM I) supplemented with, respectively, 10 and 2% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. Initial growth, at a slow rate, occurs in both medium, and irrespective of medium used, the cells were adherent and spindle shaped. Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS for growth and steroid secretion studies. The pediatric adrenocortical adenoma cell morphological features were examined under phase-contrast microscope and light microscope after stained with hematoxylin and eosin. The adrenocortical tumor cell lines were maintained at 37°C in a 95% air-5% CO_2 fully humidified environment and cultured in DMEM medium containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. All *in vitro* experiments and steroid analyses were performed in the fifth passage of the pediatric adrenocortical adenoma cell line.

Steroid hormone analysis

Steroid secretion was measured in 5 d clarified supernatant medium of pediatric tumor cell culture by commercial kits: cortisol and testosterone, fluorometric assay (AutoDELFA; Wallac, Oy, Finland); androstenedione, chemiluminescent enzyme immunoassay (Immulite 2000; Siemens, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA); 17-OH progesterone, RIA (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX).

Immunocytochemistry analysis

Approximately $1-2 \times 10^4$ cells were seeded onto coverslips in DMEM containing 10% FBS and fixed with formaldehyde 4% for 20 min. Immunocytochemistry stains were performed using antibodies against vimentin (mouse antihuman monoclonal, 1:100; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) and melan A/mart 1 (prediluted mouse antihuman monoclonal clone A103; Chemicon, Temecula, CA). The immune complex was detected by immunoperoxidase staining using the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and diaminobenzidine as previously described (30). Culture cells from human normal skin fibroblasts and human melanoma cell line LB373-MEL were used for positive controls for vimentin and melan-A, respectively. Cell cultures incubated in nonimmune primary antibody yielded negative results.

A selective IGF-IR kinase inhibitor (NVP-AEW541)

NVP-AEW541, a pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine derivate highly selective against IGF-IR, was kindly provided by Novartis Pharma (Basel, Switzerland) (24). Stock solution of this drug was prepared in dimethylsulfoxide and stored at -20°C .

Cell proliferation and caspase-3/7 activity assays

Adrenocortical tumor cell lines were plated in 96-well plates at a density of 20,000 cells/well. After starvation for 24 h in DMEM, cells were treated or not (control cells) with crescent concentrations of NVP-AEW541 (0.3–30 μM) with or without IGF-II (50 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) stimulation. After 24 to 96 h, the CellTiter 96 AQueous One solution (Promega, Madison, WI) was added and cells incubated for 3 h. The OD was measured at 450 nm in an ELISA reader.

Apoptosis analysis was based on the caspase-3/7 activity after treat-

TABLE 1. Predictive factors of metastases in pediatric and adult patients with adrenocortical tumors according to univariate analyses

Variable	Univariate analysis		
	Hazard ratio	95% CI	P value
Pediatric adrenocortical tumors			
Age (yr) ^a	1.22	0.99–1.49	0.05
Sex ^b	0.93	0.17–5.1	0.93
Mixed syndrome ^c	2.06	0.48–10.42	0.38
Tumor weight (kg) ^a	16.59	1.54–178.9	0.02
Weiss score ^a	2.11	1.2–3.72	0.009
IGF-IR expression levels ^a	1.84	1.28–2.66	0.01
Adult adrenocortical tumors			
Age (yr) ^a	0.94	0.88–1.01	0.09
Sex ^b	9.96	1.93–51.29	0.006
Mixed syndrome ^c	2.48	0.59–10.39	0.21
Tumor weight (kg) ^a	6.39	1.44–28.36	0.015
Weiss score ^a	1.74	1.24–2.44	0.001
IGF-II expression levels ^a	1.0	0.99–1.002	0.94

^a The variables were analyzed as continuous variables, and hazard ratio was associated with 1-unit increase in the variables.

^b Female sex was the reference category.

^c Cushing syndrome plus virilization.

FIG. 2. The pediatric adrenocortical adenoma cells had a fibroblastoid and spindle-shaped appearance at phase contrast microscopy (A, $\times 10$ magnification) and hematoxylin and eosin staining (B). A positive immunoreactivity for melan-A, a melanocytic differentiation marker, was detected by immunocytochemistry in 100% of the pediatric tumor cells (C, melan-A immunoreactivity; D, negative control cells). A strong cytoplasmic expression of vimentin, an intermediate filament of mesenchymal cells, was also evidenced in 100% of these adrenocortical cells (E, vimentin immunoreactivity; F, negative control cells).

ment with NVP-AEW541 (0.3–30 μM). After 3–9 h treatment, cells were incubated with the Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) for 1 h, and the luminescent signal was measured in a luminometer. All cell proliferation and apoptotic experiments were performed in triplicate.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with the SPSS software (SPSS 13.0; SPSS, Inc., Chicago, IL). Continuous data are expressed as mean $\pm$ SEM. Differences in expression levels between adenomas and carcinomas were analyzed by means of the two-tailed Mann-Whitney *U* test. Predictive factors of metastases were identified by means of Cox proportional hazards regression models, which was used to estimate hazard ratios (HR) and their 95% confidence intervals in univariate analysis.

The time of event (metastases) was defined as the time between the diagnosis of primary tumor and the first metastases. $P < 0.05$ was considered significant. Repeated measures of absorbance and luminescence were compared by ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test. The level of significance for the Bonferroni adjusted tests was set at 0.0024.

Results

IGF-II and IGF-IR expression

IGF-II transcripts were overexpressed in both pediatric adrenocortical carcinomas and adenomas (50.8 ± 18.5 vs. 31.2 ± 3.7 , respectively; $P = 0.23$) (Fig. 1A). Otherwise, *IGF-II* was mainly overexpressed in adult adrenocortical carcinomas, compared with adenomas (270.5 ± 130.2 vs. 16.1 ± 13.3 ; $P = 0.0001$) (Fig. 1B) according to previous studies (14, 15, 22). *IGF-IR* mRNA levels were significantly higher in childhood adrenocortical carcinomas than adenomas (9.1 ± 3.1 vs. 2.6 ± 0.3 ; $P = 0.0001$), whereas similar *IGF-IR* expression levels were detected in adult adrenocortical carcinomas and adenomas (1.6 ± 0.3 vs. 1.8 ± 0.5 , respectively; $P = 0.75$) (Fig. 1, C and D).

Metastases were documented in six of 23 children and seven of 34 adults with adrenocortical tumors. In pediatric adrenocortical tumors, tumor weight [HR 16.6, 95% confidence interval (CI) 1.54–178.9; $P = 0.02$], histopathological features of malignancy (Weiss score) (HR 2.11; 95% CI 1.2–3.72; $P = 0.009$), and *IGF-IR* mRNA levels (HR 1.84; 95% CI 1.28–2.66; $P = 0.01$) were associated with a higher risk of metastatic disease in univariate analysis (Table 1). In adult adrenocortical tumors, male sex (HR 9.96; 95% CI 1.93–51.29; $P = 0.006$), tumor weight (HR 6.39; 95% CI 1.44–28.36; $P = 0.01$), and Weiss score (HR 1.74; 95% CI 1.24–2.44; $P = 0.015$) were associated with a higher risk of metastatic disease in univariate analysis. *IGF-II*

expression levels were not a significant predictor of metastases (Table 1).

Characterization of the new pediatric adrenocortical tumor cell line

To dissect the cellular consequences of IGF-IR inhibition in pediatric and adult adrenocortical tumors, two adrenocortical cell lines were studied. The NCI H295 cell line was previously obtained from an invasive primary adrenocortical carcinoma in a 48-yr-old woman (29). To date, cell lines derived from pediatric adrenocortical tumors are lacking. Here we obtained a new pe-

diatric adrenocortical tumor cell culture from a functioning adrenocortical adenoma. This adrenocortical adenoma cell line has continuously been growing after eight passages. Steroid secretion was detected in 5 d supernatant medium of the fifth subcultured pediatric cell culture (cortisol 238 $\mu\text{g}/\text{dl}$, testosterone 1098 ng/dl, androstenedione >8.5 ng/ml, and 17-hydroxyprogesterone >20 ng/ml). In addition, the expression of several enzymes involved in steroid biosynthesis (3- β -hydroxysteroid dehydrogenase type II, 11- β -hydroxylase, 21-hydroxylase) was demonstrated by quantitative real-time PCR (data not shown).

The pediatric adrenocortical adenoma cell line had a fibroblastoid and spindle-shaped appearance at phase-contrast microscopy and hematoxylin and eosin staining, respectively (Fig. 2, A and B). Pediatric adrenocortical adenoma cell culture showed cytoplasmic immunoreactivity for melan-A in 100% of the culture cells (Fig. 2, C and D). The melan-A is a melanocytic differentiation marker, which has the useful property of staining steroid hormone-producing tumors, such as adrenocortical adenomas and carcinomas (31). A strong cytoplasmic expression of vimentin, the major intermediate filament protein of mesenchymal cells, was also detected in 100% of these adrenocortical cells (Fig. 2E and F). This ho-

mogeneity pattern of this cell culture suggests one cellular type isolated from the tumor fragments.

IGF-IR was expressed in both NCI H295 (1.5 ± 0.3) and pediatric adrenocortical adenoma (0.4 ± 0.06) cell lines, whereas IGF-II was mainly overexpressed in NCI H295 cells (42.4 ± 12.5), compared with pediatric adrenocortical adenoma cells (4.5 ± 1.1).

NVP-AEW541 effects on adrenocortical tumor cell lines

An additional implication of our findings concerns their potential exploitation for the identification of novel therapeutic targets. To achieve this goal, we evaluated the effects of NVP-AEW541 on blocking IGF-II stimulated proliferation of human NCI H295 and pediatric adrenocortical adenoma cells. IGF-II significantly increased proliferation of NCI H295 and pediatric adrenocortical adenoma control cells after 72 and 48 h, respectively ($P = 0.0001$). The NVP-AEW541 treatment had a significant effect on proliferation reduction of NCI H295 cells at increasing concentrations of 10 μM ($70 \pm 10\%$) and 30 μM ($33.3 \pm 6.7\%$), compared with untreated cells ($100 \pm 6.7\%$) at 24 h ($P = 0.0001$). The treatment with this IGF-IR inhibitor significantly decreased NCI H295 cell proliferation at 0.3 μM ($70.3 \pm 2.7\%$), 1.0 μM ($51.4 \pm 5.4\%$), 3.0 μM ($35.1 \pm 2.7\%$),

FIG. 3. The NVP-AEW541 treatment had a significant effect on proliferation reduction of NCI H295 cells at increasing concentrations of 0.3–30 μM after treatment for 24–96 h (A). This IGF-IR inhibitor also led to a significant decrease of the human pediatric adrenocortical adenoma cell proliferation after treatment for 24–96 h (B). Tumor cells treated with NVP-AEW541 were compared with untreated cells stimulated by IGF-II. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of triplicates. *, $P = 0.0001$.

10 μM ($18.9 \pm 0.5\%$), and 30 μM ($2.7 \pm 0.27\%$), compared with untreated cells ($100 \pm 2.7\%$) at 48 h ($P = 0.0001$). NVP-AEW541 treatment promoted a near-total reduction in NCI H295 cell proliferation at 10 and 30 μM after 96 h (Fig. 3A).

NVP-AEW541 also promoted a significant decrease of pediatric adrenocortical adenoma cell proliferation at 0.3 μM ($81.2 \pm 3\%$), 1 μM ($72.3 \pm 6\%$), 3 μM ($63.4 \pm 6\%$), 10 μM ($2 \pm 0.3\%$), and 30 μM ($2 \pm 0.3\%$), compared with untreated cells ($100 \pm 5\%$) at 48 h ($P = 0.0001$). This IGF-IR inhibitor led to a progressive reduction on proliferation of pediatric adrenocortical adenoma cells at 0.3 μM ($78.2 \pm 5.6\%$), 1.0 μM ($61.3 \pm 1.6\%$), 3.0 μM ($43.5 \pm 2.4\%$ OD), 10 μM ($1.6 \pm 0.4\%$), and 30 μM ($1.6 \pm 0.2\%$), compared with untreated cells ($100 \pm 1.6\%$) at 96 h ($P = 0.0001$) (Fig. 3B). NVP-AEW541 treatment of both adrenocortical tumor cell lines without exogenous IGF-II stimulation also promoted a significant reduction in cell proliferation (supplemental Fig. 1, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online Web site at <http://jcem.endojournals.org>).

The IC_{50} values of NVP-AEW541 were 0.2 ± 0.02 and 2.2 ± 0.06 μM for NCI H295 and for pediatric adrenocortical adenoma cells after 96 h of treatment, respectively. The NCI H295 cells were more sensitive to NVP-AEW541, showing IC_{50} value at a submicromolar concentration.

We also investigated whether cells exposed to NVP-AEW541 underwent apoptosis. NCI H295 cells treated with NVP-AEW541 showed a significant increase in caspase-3/7 activity at 1.0 μM [3714 ± 248 relative light units (RLU)], 3.0 μM (5257 ± 311 RLU), 10 μM (7069 ± 801 RLU), and 30 μM (9060 ± 733 RLU), compared with untreated cells (2019 ± 329 RLU) at 3 h ($P = 0.0001$) (Fig. 4A). The IGF-IR inhibition in pediatric adrenocortical adenoma cells significantly increased caspase-3/7 activity at 3.0 μM (3220.4 ± 56.2 RLU), 10 μM (4056 ± 277.9

RLU), and 30 μM (6324.6 ± 198.3 RLU), compared with untreated cells (1732.9 ± 61.4 RLU) at 9 h ($P = 0.0001$) (Fig. 4B).

Discussion

The IGF signaling pathway plays an important role in the regulation of adrenal growth and differentiation (17). Binding of ligands to the IGF-IR or its own overexpression initiates a cascade of events, leading to stimulation of proliferation, angiogenesis, apoptosis, and inhibition of metastases (32). Indeed, increased expression of *IGF-II* and/or *IGF-IR* have been documented in various malignant tumors (33, 34). A strong overexpression of *IGF-II* is a dominant finding in adult adrenocortical cancer, occurring in approximately 83% of malignant adrenocortical tumors (14). Nonetheless, very few studies about *IGF-II* expression in pediatric adrenocortical tumors were reported (35, 36). We demonstrated that *IGF-II* expression was deregulated in a similar manner in both pediatric adrenocortical adenomas and carcinomas.

IGF-IR overexpression was previously demonstrated in adult adrenocortical carcinomas but not adrenocortical hyperplasias and adenomas (37, 38). In this study, we identified that *IGF-IR* expression was similar in benign and malignant adult adrenocortical tumors. Otherwise, a strong increase in *IGF-IR* expression was identified only in pediatric adrenocortical carcinomas. In our cohort, *IGF-IR* expression was a predictor of metastases in children with adrenocortical tumors. The mechanisms responsible for enhanced *IGF-IR* expression in pediatric adrenocortical tumors are still unclear. Changes in IGF system expression in cancerous cells may occur as a result of loss or altered expression of tumor suppressor genes (17). In normal cells, expression of wild-type P53 was shown to inhibit *IGF-IR* expression, whereas

FIG. 4. NVP-AEW541 induced apoptosis by a significant increase of caspase-3/7 activity in NCI H295 cells at concentrations of 0.3–30 μM after 3 and 6 h (A). NVP-AEW541 also increased caspase-3/7 activity in pediatric adrenocortical adenoma cells after treatment for 6 and 9 h (B). Tumor cells treated with NVP-AEW541 were compared with untreated cells. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of triplicates. *, $P = 0.0001$.

mutant P53 up-regulates *IGF-IR* expression in different tumors (39). In our cohort, 17 of 22 children with adrenocortical tumors (77%) harbored the Arg337His P53 mutation. Nevertheless, *IGF-IR* expression levels were not associated with the presence of this mutation (data not shown). Therefore, other molecular events, like *IGF-IR* gene amplification, may be involved in *IGF-IR* overexpression in pediatric adrenocortical tumors.

Adrenocortical carcinoma remains a disease of poor prognosis, with little expectation of long-term survival if complete surgical removal is not achieved (3). Therefore, the development of new inhibitory drugs that can target signaling pathways involved in adrenocortical tumorigenesis is strongly necessary. Although kinase inhibitors hold much promise for cancer therapy, their successful application requires preclinical strategies to identify molecular markers that define susceptible tumor subtypes. Analysis of tumor-derived cell lines provides an effective system for establishing the link between specific tumor molecular aspects and the response to molecular target drugs (40). We established a new transitory cell culture derived from a human pediatric adrenocortical adenoma, thus permitting the study of a specific signaling pathway that may interfere with adrenocortical tumor growth in children. We demonstrated that NVP-AEW541, a selective *IGF-IR* kinase inhibitor, was able to block cell proliferation in a dose- and time-dependent manner in two distinct human adrenocortical tumor cell lines. The inhibitory effects of the NVP-AEW541 were induced by a significant induction of apoptotic rate. In addition to antiproliferative and proapoptotic effects, the *IGF-IR* inhibition could also increase the efficacy of other therapeutic modalities, such as radiotherapy, in breast cancer cells (41).

The ability of the NVP-AEW541 to potentially induce apoptosis was previously demonstrated in several cell lines by determining functional and morphological changes and caspase activation as well as fragmentation of nuclear DNA (25, 42, 43). Furthermore, NVP-AEW541 also inhibits cell cycle progression, inducing specific G₁ arrest (25, 42). Regarding NVP-AEW541 sensitivity, NCI H295 cells showed an IC₅₀ value comparable with that of the most sensitive cells, such as Ewing's sarcoma and neuroblastoma cell lines (25, 44). The level of sensitivity of the pediatric adrenocortical tumor cells was similar to that of hepatocellular carcinoma and gastrointestinal tumor cells (42, 43).

In conclusion, *IGF-IR* overexpression was a biomarker of pediatric adrenocortical carcinomas. In addition, we demonstrated that a selective *IGF-IR* kinase inhibitor had antitumor effects in adult and pediatric adrenocortical tumor cell lines, suggesting that *IGF-IR* inhibitors represent a promising therapy for human adrenocortical carcinoma.

Acknowledgments

We are in debt to Lourdes C. Martins (Department of Preventive Medicine, University of Sao Paulo) for the statistical review. We thank Valeria S. Lando and the staff of Laboratorio de Hormonios e Genetica Molecular LIM-42 for the steroid hormone analysis.

Address all correspondence and requests for reprints to: Madson Queiroz Almeida, M.D., Unidade de Endocrinologia do Desenvolvi-

mento e Laboratorio de Hormonios e Genetica Molecular LIM-42, Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155, 20 andar Bloco 6, 05403-900 Sao Paulo, SP, Brasil. E-mail: madsonalmeida@gmail.com; anacl@usp.br.

This work was supported by Grants 05/04726–0; 06/00244–3 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (to M.Q.A.) and by Grants 300469/2005–5 (to A.C.L.) and 300828/2005–5 (to B.B.M.) from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Disclosure Statement: We declare no duality of financial interest or direct or indirect conflict of interest on the part of any author of this manuscript.

References

- Latronico AC, Chrousos GP 1997 Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1317–1324
- Libe R, Fratticci A, Bertherat J 2007 Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer* 14:13–28
- Allolio B, Fassnacht M 2006 Clinical review: adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2027–2037
- Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J 2006 Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2650–2655
- Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L 1997 Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2027–2031
- Ribeiro RC, Sandrini R, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R 2001 An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9330–9335
- Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB 2001 An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4970–4973
- Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CAV, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, Madureira G, Domenice S, Albergaria MAP, Camargo MHA, Halpern A, Liberman B, Arnhold IJP, Bloise W, Andriolo A, Nicolau W, Silva FAQ, Wroclaski E, Arap S, Wajchenberg BL 1995 Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol* 154:2004–2009
- Wienke JA, Thompson LD, Heffess CS 2003 Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol* 27:867–881
- Almeida MQ, Latronico AC 2007 The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res* 39:461–466
- Ilesmaki V, Blum WF, Voutilainen R 1993 Insulin-like growth factor binding proteins in the human adrenal gland. *Mol Cell Endocrinol* 97:71–79
- Weber MM, Fottner C, Schmidt P, Brodowski KM, Gittner K, Lahm H, Engelhardt D, Wolf E 1999 Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. *Endocrinology* 140:1537–1543
- Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, Le Bouc Y 1994 Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1444–1453
- Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, Louvel A, Luton JP, Le Bouc Y 1997 Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2559–2565
- Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos JM, Schlumberger M, Plouin PF, Luton JP, Le Bouc Y 2001 Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res* 61:6762–6767
- Logie A, Boule N, Gaston V, Perin L, Boudou P, Le Bouc Y, Gicquel C 1999 Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. *J Mol Endocrinol* 23:23–32
- Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P 2007 The role of the IGF system

- in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 28:20–47
18. Berruti A, Terzolo M, Pia A, Angeli A, Dogliotti L 1998 Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. *Cancer* 83:2194–2200
 19. Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Casa SD, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porpiglia F, Mantero F, Reimondo G, Angeli A, Dogliotti L 2005 Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer* 12:657–666
 20. Kirschner LS 2006 Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *J Clin Endocrinol Metab* 91:14–21
 21. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JM, Hanash SM 2003 Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol* 162:521–531
 22. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF, Baudin E, Berger F, Gicquel C, Chabre O, Feige JJ 2005 Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1819–1829
 23. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, Hideshima T, Chauhan D, Joseph M, Libermann TA, Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Hofmann F, Anderson KC, Kung AL 2004 Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 5:221–230
 24. Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J, Zimmermann J, Gao J, Brueggem J, Capraro HG, Cozens R, Evans DB, Fabbro D, Furet P, Porta DG, Liebetanz J, Martiny-Baron G, Ruetz S, Hofmann F 2004 *In vivo* antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* 5:231–239
 25. Scotlandi K, Manara MC, Nicoletti G, Lollini PL, Lukas S, Benini S, Croci S, Perdicchi S, Zambelli D, Serra M, Garcia-Echeverria C, Hofmann F, Picci P 2005 Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. *Cancer Res* 65:3868–3876
 26. Weiss LM 1984 Comparative histologic study of 43 metastasizing and non-metastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 8:163–169
 27. Pinto EM, Billerbeck AE, Fragoso MC, Mendonca BB, Latronico AC 2005 Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2976–2981
 28. Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta C(T)$ method. *Methods* 25:402–408
 29. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV 1990 Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 50:5488–5496
 30. Lotfi CF, Armelin HA 2001 cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Endocrinol* 168:381–389
 31. Ghorab Z, Jorda M, Ganjei P, Nadji M 2003 Melan A (A103) is expressed in adrenocortical neoplasms but not in renal cell and hepatocellular carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11:330–333
 32. Wang Y, Sun Y 2002 Insulin-like growth factor receptor-1 as an anti-cancer target: blocking transformation and inducing apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 2:191–207
 33. Perks CM, Holly JM 2003 The insulin-like growth factor (IGF) family and breast cancer. *Breast Dis* 18:45–60
 34. Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifemberger G, Lichter P 2005 Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer* 114:249–256
 35. Wilkin F, Gagne N, Paquette J, Oligny LL, Deal C 2000 Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2048–2056
 36. West AN, Neale GA, Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez Galindo C, Pianovski MA, Oliveira Filho AG, Malkin D, Lalli E, Ribeiro R, Zambetti GP 2007 Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res* 67:600–608
 37. Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D 1997 Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur J Endocrinol* 136:296–303
 38. Kamio T, Shigematsu K, Kawai K, Tsuchiyama H 1991 Immunoreactivity and receptor expression of insulinlike growth factor I and insulin in human adrenal tumors. An immunohistochemical study of 94 cases. *Am J Pathol* 138:83–91
 39. Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D 1996 Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8318–8323
 40. McDermott U, Sharma SV, Dowell L, Greninger P, Montagut C, Lamb J, Archibald H, Raudales R, Tam A, Lee D, Rothenberg SM, Supko JG, Sordella R, Ulkus LE, Iafrate AJ, Maheswaran S, Njauw CN, Tsao H, Drew L, Hanke JH, Ma XJ, Erlander MG, Gray NS, Haber DA, Settleman J 2007 Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19936–19941
 41. Wen B, Deutsch E, Marangoni E, Frasca V, Maggiora L, Abdulkarim B, Chavaudra N, Bourhis J 2001 Tyrphostin AG 1024 modulates radiosensitivity in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 85:2017–2021
 42. Hopfner M, Huether A, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H 2006 Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 71:1435–1448
 43. Hopfner M, Baradari V, Huether A, Schofl C, Scherubl H 2006 The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours. *Endocr Relat Cancer* 13:135–149
 44. Tanno B, Mancini C, Vitali R, Mancuso M, McDowell HP, Dominici C, Raschella G 2006 Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res* 12:6772–6780

ANEXOS

ANEXO C – Artigo submetido à Molecular and Cellular Endocrinology.

Mattos GE, Lotfi CF. Comparative of FGF2, synthetic peptides 1-28 N-POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures. Submetido em Janeiro de 2011, em revisão.

Manuscript Number:

Title: Comparative effect of FGF2, synthetic peptides 1-28 N-POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures

Article Type: Research Paper

Keywords: rat primary adrenal culture, 1-28 N-POMC, ACTH, FGF2, proliferation

Corresponding Author: Dr Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Biomedical Science Institute, University of São Paulo

First Author: Gabriele E Mattos

Order of Authors: Gabriele E Mattos; Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, Ph.D

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: There is evidence that pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides other than adrenocorticotrophic hormone (ACTH) have a role in adrenal cell proliferation. We compared the activity of synthetic rat N-terminal POMC fragment 1-28 with disulfide bridges (N-POMCw) and without disulfide bridges (N-POMCw/o), with the activity of fibroblast growth factor (FGF2), a widely studied adrenal growth factor, and ACTH, in well-characterized pure cultures of both isolated adrenal Glomerulosa (G) and Fasciculata/Reticularis (F/R) cells. Three days of FGF2-treatment had a proliferative effect similar to serum, and synthetic peptide N-POMCw induced proliferation more efficiently than N-POMCw/o. Moreover, both induced proliferation via the ERK1 pathway. In contrast, sustained ACTH treatment decreased proliferation and viability through apoptosis induction, but not necrosis, and independently of PKA and PKC pathways. Further elucidation of 1-28-POMC signal transduction is of interest and primary cultures of adrenal cells were found to be useful for examining the trophic activity of this peptide.

Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, São Paulo – SP – Brasil; CEP 05508-900
Tel: 55 -11-3091 7492; Fax: 55-11-3091-7366
clotfi@usp.br; cferini@icb.usp.br

January, 2011

Dr. W. E. Rainey

Editor

Molecular and Cellular Endocrinology

Dear Dr. Rainey

We are submitting for your analysis the manuscript entitled “Comparative effect of FGF2, synthetic peptides 1-28 N-POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures” for publication as a research article in the *Molecular and Cellular Endocrinology*.

The aim of this work was to compare the proliferative activity of synthetic rat N-terminal POMC fragment 1-28, with the disulfide bridges (N-POMC^w) and without disulfide bridges (N-POMC^{w/o}), with the activity of FGF2, a well-known adrenal growth factor, and ACTH, in a pure culture of isolated rat adrenal cells, Glomerulosa cells and Fasciculata/Reticularis cells. We found that three days of FGF2 treatment had a proliferative effect similar to serum, and synthetic peptide N-POMC^w induced proliferation more efficiently than N-POMC^{w/o}, in both cell types. Moreover, both induced proliferation via the ERK1 pathway. In contrast, sustained ACTH treatment decreased proliferation and reduced viability through apoptosis induction, but not necrosis, and independently of PKA and PKC pathways. Primary cultures of rat adrenal cells were found to be useful for examining the trophic activity of synthetic rat 1-28 N-terminal POMC.

The authors have read and approved the submission of the manuscript. The article is original, is not under consideration by another journal, and has not been previously published.

Thank you for your consideration.

Sincerely,

Claudimara F. P. Lotfi, PhD

Assistant Professor

Department of Anatomy

Institute of Biomedical Science

University of São Paulo

Brazil

Comparative effect of FGF2, synthetic peptides 1-28 N-POMC and ACTH on
proliferation in rat adrenal cell primary cultures

Gabriele E. Mattos and Claudimara F. P. Lotfi

Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São
Paulo 05508-000, SP, Brazil.

Corresponding author:

Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, PhD

Departamento de Anatomia

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo

São Paulo, 05508-000

Brazil

Phone: 55-11-3091-7492

Fax: 55-11-3091-7366

E-mail: clotfi@usp.br

Abstract

There is evidence that pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides other than adrenocorticotrophic hormone (ACTH) have a role in adrenal cell proliferation. We compared the activity of synthetic rat N-terminal POMC fragment 1-28 with disulfide bridges (N-POMC^w) and without disulfide bridges (N-POMC^{w/o}), with the activity of fibroblast growth factor (FGF2), a widely studied adrenal growth factor, and ACTH, in well-characterized pure cultures of both isolated adrenal Glomerulosa (G) and Fasciculata/Reticularis (F/R) cells. Three days of FGF2-treatment had a proliferative effect similar to serum, and synthetic peptide N-POMC^w induced proliferation more efficiently than N-POMC^{w/o}. Moreover, both induced proliferation via the ERK1 pathway. In contrast, sustained ACTH treatment decreased proliferation and viability through apoptosis induction, but not necrosis, and independently of PKA and PKC pathways. Further elucidation of 1-28-POMC signal transduction is of interest and primary cultures of adrenal cells were found to be useful for examining the trophic activity of this peptide.

Key Words: rat primary adrenal culture, 1-28 N-POMC, ACTH, FGF2, proliferation

53 ***Introduction***

54 The *in vivo* growth-promoting effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on
55 adrenal cortex cells is well-known, and contrasts sharply with the ACTH growth-
56 inhibitory effect *in vitro*. Studies *in vitro* have demonstrated the growth inhibitory effect
57 of ACTH in Y1 adrenocortical tumor cells (Masui & Garren, 1971) and in rat, bovine
58 and human primary cultures of adrenal cells (Ramachandran & Suyama, 1975; Hornsby
59 & Gill, 1977; Simonian & Gill, 1981). On the other hand, we found a dual effect of
60 ACTH on proliferation of the Y1 cell line, where 2 h of treatment stimulated entry into
61 S-phase while treatment longer than 4 h inhibited DNA synthesis (Lotfi et al., 1997).
62 More recently, we described differences between the ACTH and fibroblast growth
63 factor (FGF2) signal transduction mechanisms seen in rat primary adrenocortical cells
64 and those observed in the Y1 cell line, indicating that, *in vitro*, ACTH blockage of the
65 mitogenic effect occurs in normal adrenal cells regardless of c-Fos induction (Mattos &
66 Lotfi, 2005).

67 There is evidence that the POMC NH₂-terminal fragments can act as growth
68 factors in the adrenal gland, and that in spite of presenting a decreased steroidogenic
69 effect itself, N-POMC can modulate the ACTH-steroidogenic action (Estivariz et al.,
70 1982; Lowry et al., 1983; Fassnacht et al., 2003). Furthermore, previous findings from
71 our lab showed that administration of modified synthetic N-POMC₁₋₂₈ without disulfide
72 bridges (N-POMC^{w/o}), to dexamethasone (DEX)-treated rats induces S-phase entry in
73 all zones of the adrenal cortex (Torres et al., 2010). Moreover, the comparison of effects
74 of synthetic peptide N-POMC₁₋₂₈ with Cys²-Cys²⁴ and Cys⁸-Cys²⁰ disulfide bridges
75 corresponding to the structure of endogenous POMC (N-POMC^w) and N-POMC^{w/o}
76 showed that synthetic N-POMC^w has a mitogenic effect in the zona glomerulosa and

zona reticularis of the adrenal cortex and a possible involvement with cyclin E (Mendonça & Lotfi, in press).

Here we report the effect of N-POMC^w, N-POMC^{w/o}, ACTH and FGF2 on the survival and proliferation of normal rat adrenal cells. Exploring a well-characterized pure culture of both isolated adrenal Glomerulosa (G) cells and Fasciculata/Reticularis (F/R) cells we assessed the intrinsic response to these peptides free of tissue organization constraints and the systemic influence of other endocrine and paracrine factors. We found that three days of FGF2 treatment promoted a proliferative effect similar to that of serum, and synthetic peptide N-POMC^w induced proliferation more efficiently than N-POMC^{w/o}. Moreover, both treatments induced proliferation via the ERK1/2 pathway. In contrast, sustained ACTH treatment decreased proliferation and reduced viability through apoptosis induction, but not by necrosis, and independently of PKA and PKC pathways.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), diaminobenzidine (DAB), Oil Red O and DNase I were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Collagenase was purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Falcon primary tissue culture dishes and plates were purchased from Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA). ThermanoxTM coverslips were from Nalge Nunc International (Rochester, NY, USA). Monospecific rabbit polyclonal anti-Phospho-ERK antibody, U0126 and H-89 (MEK and PKA inhibitors, respectively) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). The PKC inhibitor bisindolylmaleimide and rabbit polyclonal antibody to β -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa

Cruz, CA, USA). Mouse monoclonal antibody to tyrosine hydroxylase was purchased from ImmunoStar (Hudson, WI, USA), and P450 cytochrome 11 β -hydroxylase was purchased from Chemicon (Temecula, CA, USA). Donkey anti-rabbit IgG polyclonal antibody and sheep anti-mouse IgG polyclonal antibody, both conjugated with horseradish peroxidase, as well as an enhanced chemiluminescence detection system, were purchased from Amersham-Pharmacia (Piscataway, NJ, USA). An anti-mouse Vectastain Elite ABC kit was purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). A methyl tetrazolium salt (MTS) assay (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) was purchased from Promega (Madison, WI, USA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Cultilab (Campinas, SP, Brazil). A Bradford assay was purchased from BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). An Annexin-V kit (Vybrant Apoptosis Assay Kit #2) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Formaldehyde, hematoxylin, eosin, lithium carbonate, isopropanol and trypan blue were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals were of analytical grade (> 99% purity).

2.2. Peptides

Human synthetic ACTH₁₋₃₉ (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) was used at concentrations of 0.001-100 nM. Bovine recombinant fibroblast growth factor type 2 (FGF2) was kindly provided by Prof. AG Gambarini (Biochemistry Department, Chemistry and Biochemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil) and used at 0.05-1 nM. Rat N-POMC₁₋₂₈ peptide (COOH-Tryptophan; **Methionine**₂; Leucine; Glutamic acid; Serine; Serine; Glutamine; **Methionine**₈; Glutamine; Aspartic acid; Leucine; Threonine; Threonine; Glutamic acid; Serine; Asparagine; Leucine; Leucine; Alanine; **Methionine**₂₀; Isoleucine; Arginine; Alanine; **Methionine**₂₄; Arginine; Leucine; Aspartic acid; Leucine-NH₂) was synthesized by the Department of

Biochemistry and Biophysics of the Federal University of São Paulo (UNIFESP). To avoid undefined disulfide bonds the peptide was synthesized with the replacement of cysteine 2, 8, 20 and 24 residues by methionine. Another rat N-POMC₁₋₂₈ peptide was synthesized with cysteines and the disulfide bridges (Bachem America Inc., Torrence, CA, USA); both were used at 0.01 nM -10 µM.

2.3. Preparation of primary adrenal cell cultures

Adult (50-60 days) male Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus*), weighing 250–300 g, were obtained from the animal facilities of the University of São Paulo Institute of Biomedical Sciences. Animals were housed 4-5 per cage, maintained on a 12 h light/ 12 h dark cycle (lights on at 07.00) and at controlled temperature (22°C) with food (standard rat chow) and water available *ad libitum*. Animals were killed between 07.00 h and 09.00 h by decapitation, and their adrenals were promptly removed and further processed as required. The Ethics in Research Committee of the University of São Paulo Institute of Biomedical Sciences approved the study protocol. Dispersed G and F/R cells were obtained by sequential collagenase digestion and mechanical disaggregation as previously described in Mattos & Lotfi (2005). G or F/R cells were suspended in DMEM containing 10% FBS, 25 mg/l of ampicillin and 100 mg/l of streptomycin, after which they were seeded, according to the experiment, onto Falcon primary tissue culture dishes/plates. Prior to their use, cells were cultured for 48 h at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂. The cultures were subsequently maintained for 24 h in DMEM/0.5% FBS before treatment.

2.4. Immunocytochemistry for expression of tyrosine hydroxylase, HE and Oil Red O stains

Approximately 2×10^4 G, F/R cells, PC12 or NIH3T3 Clone A31 cells were seeded onto ThermanoxTM coverslips (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)

in DMEM with 10% serum. After 48 h, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 3.7% formaldehyde for 20-30 min. The specific antibody for rat tyrosine hydroxylase was applied and detected by immunoperoxidase staining using the anti-mouse Vectastain Elite ABC kit and DAB according to the manufacturer's protocol. On the control coverslips, normal horse serum was used in place of the specific antibody. Two coverslips per reaction were analyzed and the labeled cells counted. Data from different culture preparations were obtained in order to calculate the final percentage of labeled cells. For H&E staining, fixed cells on coverslips were dipped in Harris's hematoxylin followed by dipping in Putt's eosin, then washed and mounted with mineral oil. For Oil Red O staining (ORO) (Ramirez-Zacarias et al. 1992) a stock-solution was prepared with 1.4 g ORO dissolved in 400 ml of 99% isopropanol and left at room temperature (22°C). This solution was filtered using regular filter paper, mixed with 3 parts of distilled water to 2 parts of ORO stock-solution, left to stand for 30 min at room temperature, and filtered again before use. Cells were briefly rinsed with 60% isopropanol, and ORO stain was then applied for 30 min at room temperature followed by one wash with 60% isopropanol. After several washes with distilled water the cells were counterstained with Harris's hematoxylin solution. Saturated lithium carbonate solution was used to intensify the nuclei staining; cells were then rinsed twice with distilled water, air dried and mounted with glycerol 10% in PBS. Images were captured in a Nikon light microscope.

2.5. Western blotting

Cells were plated onto 60-mm primary tissue culture dishes at a concentration of 9×10^5 cells/dish in DMEM containing 10% FBS and placed in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 24 h. After 24 h of serum-starvation (DMEM + 0.5% FBS) cells were treated as indicated in the experiments. The cells were lysed in ice-cold assay

buffer, consisting of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, protease and phosphatase inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml of leupeptin, 2 µg/ml of aprotinin, 2 µg/ml of pepstatin, 50 mM sodium fluoride and 1 mM sodium orthovanadate). The insoluble material was pelleted at 14,000 rpm for 15 min at 4°C, and protein concentrations were quantified using a Bradford assay. Samples (10–50 µg) were separated on a 10-15% gel by SDS-PAGE and transferred electrophoretically to Hybond-C nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with fat-free powdered milk and Tris-buffered saline containing 1% Tween 20 (TBST). Membranes were then incubated with anti-P450 11β-hydroxylase (1:1000), anti-tyrosine hydroxylase (1:5000), anti-Phospho-ERK (1:2000) and anti-β-actin (1:4000). Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and enhanced chemiluminescence. Immunoblot results were quantitated densitometrically using GeneSnap and GeneTools softwares. The results are representative of three independent experiments. Ponceau staining of the electroblotted membranes was used to monitor protein transfer and protein loading.

2.6. Proliferation and Viability assays

Approximately 10^5 cells/well of G or F/R cells were plated onto 24-well primary tissue culture plates in DMEM + 10% FBS and placed in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 24 h. The cultures were subsequently maintained in DMEM + 0.5% FBS for 24 h, after which they either received no treatment or were treated daily for 3 days with ACTH (0.001 nM, 0.1 nM, 1 nM or 100 nM). On each day, cells from three wells were dispersed and mixed with 0.4% Trypan Blue. Stained and unstained cells were counted using a hemocytometer. The number of viable cells was expressed as the mean ± SD of three wells. All experiments were replicated in at least three different cultures.

For the MTS assay, 3×10^4 cells/well of G or F/R cells were plated onto 96-well tissue culture plates in DMEM + 10% FBS and placed in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 24 h. The cells were subsequently maintained in DMEM + 0.5% FBS for 24 h, 48 h or 72 h with or without ACTH (0.001 nM, 1 nM or 100 nM), FGF2 (1, 5, 10 or 20 ng/ml), N-POMC₁₋₂₈ (0.01 nM, 1 nM, 100 nM or 10 µM) or 10% FBS. After the addition of 20 µl of the MTS solution, the plate was incubated at 37°C for 4 h in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Optical density was read at 490 nm using an ELISA plate reader (ELx800 with KC Junior Software; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Untreated cultures were used as controls, and media without cells were used as blanks. Quantification of cell proliferation was expressed as mean optical density $\pm$ SD for three wells. All experiments were replicated in at least three different cultures.

2.7. Annexin V assay

Approximately 5×10^5 G or F/R cells were plated onto 60-mm tissue culture dishes in DMEM containing 10% FBS and placed in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 24 h. The cultures were subsequently maintained in DMEM containing 0.5% FBS for 24, 48 or 72 h with or without ACTH (1 or 100 nM) or 10% FBS. Annexin-binding buffer (25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, 0.1% bovine serum albumin), 5 µl of Alexa Fluor-488 Annexin V and 1 µl of 100 µg/ml propidium iodide (PI), in a final volume of 100 µl, was added to the cell suspension, which was then incubated in the dark for 15 min at room temperature. Since ACTH treatments lead to progressive detachment of adrenal cells from the primary culture, dead cells in suspension were collected together with trypsinized cells. Data acquisition and analysis were performed using a single-laser flow cytometer and the CellQuest program (FACScalibur; Becton Dickinson, Chácara Santo Antônio, SP, Brazil). A total of 20,000 events per sample were counted. Light-scatter dot plots of forward scatter (cell size) and

side scatter (granularity) were used to isolate ‘debris’ from G and F/R cell populations. Bidimensional fluorescence dot plots (FL1 vs. FL3) were used to identify labeled cell subpopulations after staining with Annexin-fluorescein isothiocyanate (Annexin-FITC) and PI. Unstained cells were assumed to be viable, PI-stained cells were classified as necrotic, Annexin-FITC-stained cells were classified as early apoptotic cells, and double-stained cells were classified as late apoptotic cells.

2.8. Data analysis

The data are presented as mean $\pm$ SD. Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparisons test.

3. Results

3.1. Hematoxylin-Eosin and Oil red stains

The analysis of H & E-stained cultures showed that the majority of cells presented an epithelial-like morphology, while fibroblast-like cells represented less than 0.1% of the cell population (Fig 1A and 1B). After seeding, G cells (Fig 1A) spread faster than F/R cells while these were smaller and tended to form tight clusters (Fig 1B). The nuclei of F/R cells presented intense hematoxylin staining, indicating more condensed chromatin, in contrast with the brighter nuclear staining of G cells. Using the lipid-specific dye, oil red O, we observed lipid-storage vesicles (Fig 1C-1H) with variable sizes in the cytoplasm of both cell types. F/R cells appeared to present bigger and more numerous oil red O-stained vesicles (Fig 1E and 1F); however, this difference might be due to them having a less spread morphology in comparison with G cells (Fig 1C and 1D). The mouse fibroblast cell line NIH3T3 clone A31 was used as negative control (Fig 1G and 1H).

3.2. Specific expression of P450 11 β -hydroxylase and tyrosine hydroxylase in G and F/R cells

In order to characterize the enzymes expressed in G and F/R cells in culture we examined cytochrome P450 11 β -hydroxylase and tyrosine hydroxylase in cultures of both cell types (Fig 2A). Expression of P450 11 β -hydroxylase was mild in G cells and strong in F/R cells. Tyrosine hydroxylase expression was detected in F/R cells but not in G cells. To quantify the number of adrenal medullary cells that survived after 24 h-serum starvation in F/R cells in culture, we immunostained F/R cell preparations with a specific anti-rat tyrosine hydroxylase antibody (Fig 2B). In F/R culture, tyrosine hydroxylase-positive cells accounted for only $2 \pm 1\%$ of the total number of seeded F/R cells (Fig 2Ba-b). The rat pheochromocytoma PC12 cell line was used as positive control (Fig 2Bc-d).

3.3. FGF2 and synthetic peptide N-POMC₁₋₂₈ induce ERK phosphorylation

As previously described in Mattos and Lotfi (2005) and here, FGF2 is a strong activator of MAPK-ERK1/2, whereas ACTH failed to stimulate this pathway in adrenal cells in primary culture. Moreover, ACTH antagonizes the FGF2 effect inhibiting ERK1/2 activation in G and F/R cells (Fig 3A). To analyze the effect of a synthetic N-POMC₁₋₂₈ on the ERK1/2 pathway two different peptides were synthesized. A synthetic N-POMC₁₋₂₈ with disulfide bridges in the cysteine residues (N-POMC^w), and a modified synthetic N-POMC₁₋₂₈ without disulfide bridges and with cysteine 2, 8, 20 and 24 residues replaced by methionine (N-POMC^{w/o}), to avoid undefined bonds. Only the 10 μ M concentration of both N-POMC peptides stimulated ERK1/2 phosphorylation in G and F/R cells, and the other concentration failed to stimulate this pathway efficiently (Fig 3B). However, ERK1/2 phosphorylation was detected 5 min after stimulation with

N-POMC^w (Fig 3D-C) whereas with N-POMC^{w/o} it occurred later, after 15 min (Fig 3B).

3.4. Synthetic peptide N-POMC^w promotes proliferation more efficiently than N-POMC^{w/o}

The analysis by colorimetric MTS assay showed that FGF2 treatment for three days induced proliferation in serum-starved G and F/R cells similar to serum (Fig 4A and 4B). Irrespective of the dose utilized FGF2 promoted a significant time-dependent increase in proliferation in both cell types, except in G cells with 0.05 nM at 24 h (Fig 4A). The same analysis using treatment with both synthetic N-POMC peptides showed that 1 nM and 100 nM N-POMC^w efficiently induced proliferation in both cell types (Fig 4C and 4D). However, 10 μ M of N-POMC^w and N-POMC^{w/o}, which stimulated ERK1/2 phosphorylation, induced proliferation in G cells only after 24 h of treatment (Fig 4C). In addition, only the concentration of 10 μ M N-POMC^{w/o} promoted significant proliferation in F/R cells (Fig 4D).

3.5. ERK1/2 pathway is involved in the proliferative response to FGF2 and N-POMC.

Since both FGF2 and 10 μ M N-POMC activated MAPK-ERK1/2 in G and F/R cells (Fig 4), we decided to test the MEK1/2 inhibitor U0126 against the FGF2- and N-POMC-induced proliferation in G and F/R cells (Fig 5 and 6). After determining the effective concentration of U0126 in immunoblotting experiments in both cell types (not shown), we employed this inhibitor to block the FGF2 and N-POMC proliferative response (Fig 5 and 6). The utilization of the MEK inhibitor prevented, with different patterns, a proliferative response to FGF2 and both N-POMC peptides in G and F/R cells.

3.6. Sustained ACTH treatment causes a fall in viability by inducing apoptosis in G and F/R cells

Daily ACTH treatment for three days produced a time-dependent cytotoxic effect in serum-starved G and F/R cells as observed in both trypan blue dye exclusion and metabolically viable cells (MTS) assays (Fig 7). As confirmed by both assays 1 nM ACTH induced a steady decay of cell viability with a half-time around 24 h for G cells (Fig 7A, 7C and 7E) and 60 h for F/R cells (Fig 7B and 7F). Moreover, in G cells 24 h- ACTH treatment showed a dose-dependent cytotoxic effect in contrast with F/R cells which presented a delay in this effect (Fig 7B and 7F). Using the trypan blue dye exclusion assay, it was observed that serum-starved G cells easily proliferate in culture compared with F/R cells, which maintain similar numbers of cells under serum-starved conditions. The ACTH-induced decrease in cell viability is due to accentuated apoptosis rather than necrosis (Table 1 and Fig 8). In both cell types, ACTH, but not serum, lead to Annexin V-FITC and Annexin V-FITC/PI staining indicating, respectively, early and late apoptosis. However, the number of necrotic cells remained quite constant, never exceeding $5 \pm 3\%$ (mean count for four different culture preparations), in both cell types. The specific inhibitors of PKA and PKC, respectively 1 μ M H-89 and 0.5 μ M bisindolylmaleimide, did not reverse the cytotoxic effect of ACTH in G cells and F/R cells (Fig 9A and 9B), despite the fact that both agents efficiently inhibited CREB/CREM, a well-known transcription factor activated by ACTH (Fig 9C).

4. Discussion

Primary cultures of adrenocortical cells have proven to be useful for examining mechanisms controlling the many aspects of adrenal physiology. The successful acquisition and characterization of primary rat adrenocortical G cells and F/R cells

provided us with a tool to analyze the effects of FGF2, N-POMC peptides and ACTH in normal adrenocortical cells. FGF2 is considered an adrenal mitogen and has been studied in a variety of *in vitro* systems, including human and mouse tumor cells, respectively NCI-H295 (Boulle et al., 2000) and Y-1 cells (Gospodarowicz & Handley, 1975; Armelin & Lotfi, 1999), and normal bovine and rat adrenocortical cells (Hornsby & Gill, 1977; Mattos & Lotfi, 2005). Here we found a concentration-dependent increase in viability and proliferation with FGF2 in G and F/R cells similar to that obtained with serum. Previously we found that in serum-starved G cells, but not in F/R cells, 24 h treatment with 0.05 nM FGF2 produced a two-fold increase in the percentage of nuclei labeled with BrdU (Mattos & Lotfi, 2005). Here, using a three-day FGF2 sustained treatment in a viability assay, we report that both cell types are responsive to FGF2, and their response is mediated by strong activation of ERK. Although the response of normal adrenal cells and adrenocortical tumor cells to growth stimulators is described as being moderate, it is noteworthy that the response of primary cell cultures of rat adrenal gland cells to FGF2 alone is comparable to that observed with serum.

The ERK pathway is also significantly stimulated by both N-POMC synthetic peptides used, in agreement with the findings described for the NCI-H295 human adrenal tumor cell line stimulated by 1-28-POMC presenting disulfide bridges (Fassnacht et al., 2003). Those authors found that ERK phosphorylation was present between 10 and 20 min after stimulation with 10 μ M 1-28-POMC. Here, we showed that in rat adrenal normal cells, only 10 μ M N-POMC significantly phosphorylated ERK in G and F/R cells, with different kinetics depending on the presence or not of disulfide bridges. However, different N-POMC^w concentrations lower than 10 μ M did not activate the ERK pathway, but promoted an increase in viability/proliferation in both G and F/R cells. Moreover, the N-POMC-proliferative effect occurs, at least in part,

through activation of the ERK pathway, as observed using the specific inhibitor of ERK, U0126. In contrast, N-POMC^{w/o} was less efficient in increasing cell proliferation as measured by the MTS assay, in spite of N-POMC^{w/o} phosphorylating the ERK pathway. Thus, our results showed the involvement of ERK activation in the G and F/R cells stimulated by N-POMC, irrespective of the conformational proprieties of N-POMC^{w/o}. Recent experiments from our laboratory using rats treated with dexamethasone and both peptides, N-POMC^w and N-POMC^{w/o} (Mendonça & Lotfi, in press), produced comparable results with the two peptides promoting an increase in BrdU incorporation in the adrenal cortex, suggesting that the conformational properties of methionine-modified N-POMC, without the disulfide bridges, can determine its proliferative effects in the adrenal cortex. Although the usual strategy to prevent the formation of disulfide bridges in a cysteine-containing peptide is to replace the cysteine residues with serine residues, in this study we chose to preserve the sulfur (S) atom in the side-chains of amino acid residues 2, 8, 20 and 24 and, at the same time, prevent the formation of disulfide bridges. Thus, the four cysteines were replaced by four methionines. Since the methionine-containing analogue was active, we assume that it has conformational properties similar to those of the cysteine-containing peptide, probably mainly due to hydrophobic interactions of the side chain groups of methionines with those of Leu, Ala, Ile, Phe and Trp also present in the peptide. This is merely speculation as we have no experimental evidence so far, although this will be very interesting to obtain in the future.

ACTH has a negative effect on ERK activation, and indeed antagonizes the effect of FGF2 by inhibiting the activation of this pathway. Here it had a dose- and time-dependent anti-mitogenic effect on G cells, whereas F/R cells presented a certain degree of resistance to the effects of ACTH. Differences between cultures of

glomerulosa and fasciculata/reticularis cells in terms of their response to ACTH have also been observed in studies on the influence that the extracellular matrix and integrins have over the functional proprieties of these cells (Otis et al., 2007). In the present study, the ACTH-induced decrease in cell viability was accompanied by a significant increase in cell death via apoptosis but not via necrosis in both cell types. In addition, the results of the analysis of proliferation, viability and apoptosis support the notion that F/R cells are more resistant to the cytotoxic effects of ACTH than are G cells. In contrast, Otis et al. (2005) found that after three days of treatment with 5 nM angiotensin II, which also inhibits proliferation in primary cultures of rat adrenal G cells, the number of apoptotic G cells was low and did not vary. Carsia and collaborators (1997) demonstrated that apoptosis in short-term organ culture without ACTH was extensive, relatively rapid in onset and increased with the duration of incubation. Nevertheless, ACTH attenuated (by 59%) but did not block apoptosis in this experimental model and its effect was found to be largely restricted to the zonae fasciculata and reticularis. In contrast, hypophysectomy-induced apoptosis in the rat adrenal gland is slow and restricted to a subpopulation of zona reticularis cells (Carsia et al., 1996). The discrepancies among *in vitro* cell cultures, *in vitro* explant cultures of glands and *in vivo* models, in terms of the magnitude of apoptosis, support the notion of involvement of the intraglandular autonomic innervation in some degree of gross adrenal structural integrity or compartmentalization, but with a contribution also coming from intraglandular factors (Shepherd & Holzwarth, 2001).

From these observations partially opposing activities of FGF2, 1-28-N-POMC and ACTH can be established in normal adrenocortical cells: FGF2 and N-POMC activate ERK1/2 and cause an increase in the viability/proliferation of normal adrenal cells, whereas ACTH has no effect or even negative effects on ERK activation,

decreasing cell numbers through apoptosis. Further elucidation of 1-28-POMC signal transduction is of interest and primary cultures of adrenal cells showed themselves to be useful for examining the trophic activity mediated by this peptide.

Legends

Figure 1 Hematoxylin & Eosin (A and B) and Oil Red (C-H) staining in Glomerulosa (A, C and E), Fasciculata/Reticularis (B, D and F) and NIH3T3 (G and H) cells after 48 h in DMEM/10% FBS. Light microscopy magnification: 400 × (A-D and G) and 1000 × (E, F and H).

Figure 2 Expression of cytochrome P450 11β-hydroxylase and tyrosine hydroxylase in Glomerulosa (G) and Fasciculata/Reticularis (F/R) cells. **A:** Cell lysates were assayed by Western blotting using specific cytochrome P450 11β-hydroxylase antibody and tyrosine hydroxylase antibody. **B:** F/R cells (a and b) were serum-starved in DMEM/0.5% FBS for 24 h. PC12 cells (c and d) were maintained in DMEM/10% FBS/5% horse serum. Tyrosine hydroxylase expression was revealed by an immunoperoxidase reaction using anti-rat tyrosine hydroxylase. In the control experiments (b and d), normal horse serum was used instead of the specific antibody. Light microscopy magnification 400 ×.

Figure 3 Analysis of ERK phosphorylation in Glomerulosa (G) and Fasciculata/Reticularis (F/R) cells. Serum-starved cells were not treated (Control or C) or treated **A:** for 15 min with 1 nM ACTH (A), 0.5 nM FGF2 (F), combined treatments of 1 nM ACTH + 0.5 nM FGF2 (A+F) or 10% FBS (Serum); **B:** for 15 min with 10 μM, 100 nM, 1 nM, 0.01 nM, of N-POMC₁₋₂₈ without bridges or 1 nM ACTH (A); **C:** for 15 min with 10 μM (10), 100 nM (100), 1 nM (1) of N-POMC₁₋₂₈ with bridges, 1 nM ACTH (A) or 0.5 nM FGF2 (F); **D:** with 10 μM of N-POMC₁₋₂₈ with bridges for 5,

10, 15 and 30 min or 1 nM ACTH (A) and 0.5 nM FGF2 (F) for 15 min. Quantitative analysis of ERK phosphorylation is indicated as mean percentage against control (non treated control cells = 100%) $\pm$ SD. Statistical significance (one-way ANOVA with Tukey post-test): * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (treatments vs. control) (n=3).

Figure 4 Effects of FGF2 and N-POMC₁₋₂₈ with and without bridges on viability of rat adrenocortical cells. Serum-starved Glomerulosa (A and C) and Fasciculata/Reticularis cells (B and D) were exposed to 0.05 and 0.5 nM FGF2, 1 nM, 100 nM and 10 μ M of N-POMC₁₋₂₈ or 10% FBS (Serum) for 24, 48 and 72 h. Cell proliferation was measured using the MTS assay and read at 490 nm. Results are expressed as mean Optical Density (OD) $\pm$ SD. Statistical significance (one-way ANOVA with Tukey post-test): * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (treated vs. control of the respective day) (n=4).

Figure 5 Effects of FGF2 on proliferation of rat adrenocortical cells after pharmacological inhibition of the MEK/ERK pathway. Serum-starved Glomerulosa (A) and Fasciculata/Reticularis (B) cells were pre-treated for 30 min with 10 μ M MEK inhibitor U0126 (U0) or DMSO 0.1% and either not stimulated, with DMEM/0.5% FBS (Control), or stimulated with 0.5 nM FGF2 as indicated, for 24, 48 and 72 h. Cell proliferation was measured using the MTS assay and read at 490 nm. Results are expressed as mean Optical Density (OD) $\pm$ SD. Statistical significance (one-way ANOVA with Tukey post-test): * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (treated vs. control of the respective day), # P <0.05; ## P <0.01; ### P <0.001 (U0+F vs. FGF of the respective day) (n=3).

Figure 6 Effects of N-POMC₁₋₂₈ with and without bridges on proliferation of rat adrenocortical cells after pharmacological inhibition of the MEK/ERK pathway. Serum-starved Glomerulosa (A and C) and Fasciculata/Reticularis (B and D) cells were pre-treated for 30 min with 10 μ M MEK inhibitor U0126 (U0) or DMSO 0.1% and either

not stimulated in DMEM/10% FBS (Serum) or DMEM/0.5% FBS (Control) or stimulated with 100 nM or 10 μ M N-POMC₁₋₂₈ as indicated, for 24 (white bars) or 48 h (gray bars). Cell proliferation was measured using the MTS assay and read at 490 nm. Results are expressed as mean Optical Density (OD) $\pm$ SD. Statistical significance (one-way ANOVA with Tukey post-test): * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (treated vs. control of the respective day), # P <0.05; ## P <0.01; ### P <0.001 (U0126+NPOMC vs. NPOMC of the respective day) (n=3).

Figure 7 Time and dose-dependent effects of ACTH on proliferation and viability of rat adrenocortical cells from the Glomerulosa (A, C and E) and Fasciculata/Reticularis (B, D and F). **A-D**: Trypan blue dye exclusion assay. Cells were maintained in DMEM/10% FBS for 24 h and subsequently serum-starved in DMEM/0.5% FBS for 24 h (0 h). Cells were treated with 1 nM ACTH for 24, 48 and 72 h (A and B) or 0.001, 0.1 and 1 nM ACTH for 24 h (C and D). Results represent mean of unstained/viable cells $\pm$ SD. **E and F**: MTS assay. Serum-starved viable cells were exposed to 0.001 nM and 1 nM ACTH or 10% FBS (Serum) for 24, 48 and 72 h or not treated (Control). Results are expressed as mean Optical Density (OD) read at 490 nm $\pm$ SD. Statistical significance (one-way ANOVA with Tukey post-test): * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (treated vs. control) (n=3-5).

Figure 8 Pro-apoptotic representative effect on Glomerulosa (G) and Fasciculata/Reticularis (F/R) cells treated for 72 h. Serum-starved cells were, respectively, treated with 10% FBS (Serum), untreated (Control) or treated with 1 nM ACTH. Cell viability, necrotic and apoptotic status were measured by flow cytometry following double-staining with Annexin V-FITC (FL1-H) and propidium iodide (FL3-H). Unstained cells (lower left quadrant) are assumed to be viable, PI-stained cells (upper left quadrant) are assumed to be necrotic, Annexin V-FITC-stained cells (lower

right quadrant) are assumed to be early-apoptotic and double-stained cells (upper right quadrant) are assumed to be late-apoptotic. Values inside quadrants indicate the percentage (%) of cells in each condition in this representative experiment. See Table 1 for means $\pm$ SD values of four independent experiments.

Figure 9 Effects of ACTH on proliferation of rat adrenocortical cells and on phosphorylation of CREB protein after pharmacological inhibition of PKA and PKC pathways. Serum-starved Glomerulosa (A) and Fasciculata/Reticularis (B) cells were pretreated for 30 min with 0.5 μ M bisindolylmaleimide (Bis), 1 μ M H-89 (H89) or 0.1% DMSO and either not stimulated (Control) or stimulated with 1 nM ACTH as indicated, for 24 h (A), 72 h (B) or 15 min (C). Cell proliferation was measured using the MTS assay and read at 490 nm. Results are expressed as mean Optical Density (OD) $\pm$ SD. Cell lysates were assayed by Western blotting using total and phospho-CREB (P-CREB) protein-specific antibodies. The quantitative analysis of P-CREB is indicated as the percentage in relation to control (non treated cells = 100%) $\pm$ SD. Statistical significance (one-way ANOVA with Tukey post-test): * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 (treatment vs. control); # P <0.05; ### P <0.001 (Bis+ACTH vs. ACTH or H89+ACTH vs. ACTH or Bis+H89+ACTH vs. ACTH) (n=3-5).

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

499 ***Funding***

500 GEM is a recipient of scholarships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado
501 de São Paulo (FAPESP, Foundation for the Support of Research in the State of São
502 Paulo); CFPL received funding from FAPESP, from Conselho Nacional de
503 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, The National Council for Scientific
504 and Technological Development) and from the Pró-Reitoria de Pesquisa da
505 Universidade de São Paulo (University of São Paulo Dean's Office for Research
506 Projects).

507

508 ***Acknowledgements***

509 We thank Dr. Maria Aparecida Juliano from the Department of Biochemistry and
510 Biophysics of the Federal University of São Paulo (UNIFESP) for the synthesis of
511 modified N-POMC^{w/o} peptide.

512

513 ***References***

514 Armelin, H.A. and Lotfi, C.F. (1999) Control of the adrenocortical cell cycle:
515 interaction between FGF2 and ACTH. Braz J Med Biol Res 32, 841-843.
516 Boulle, N., Gicquel, C., Logie, A., Christol, R., Feige, J.J. and Le Bouc, Y. (2000)
517 Fibroblast growth factor-2 inhibits the maturation of pro-insulin-like growth factor-II
518 (Pro-IGF-II) and the expression of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-
519 2) in the human adrenocortical tumor cell line NCI-H295R. Endocrinology 141, 3127-
520 3136.

521 Carsia, R.V., Macdonald, G.J., Gibney, J.A., Tilly, K.I. and Tilly, J.L. (1996) Apoptotic
522 cell death in the rat adrenal gland: an in vivo and in vitro investigation. *Cell Tissue Res*
523 283, 247-254.

524 Carsia, R.V., Tilly, K.I. and Tilly, J.L. (1997) Hormonal modulation of apoptosis in the
525 rat adrenal gland in vitro is dependent on structural integrity. *Endocrine* 7, 377-381.

526 Estivariz, F.E., Iturriza, F., McLean, C., Hope, J. and Lowry, P.J. (1982) Stimulation of
527 adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides. *Nature* 297, 419-422.

528 Fassnacht, M., Hahner, S., Hansen, I.A., Kreutzberger, T., Zink, M., Adermann, K.,
529 Jakob, F., Troppmair, J. and Allolio, B. (2003) N-terminal proopiomelanocortin acts as
530 a mitogen in adrenocortical tumor cells and decreases adrenal steroidogenesis. *J Clin*
531 *Endocrinol Metab* 88, 2171-2179.

532 Gospodarowicz, D. and Handley, H.H. (1975) Stimulation of division of Y1 adrenal
533 cells by a growth factor isolated from bovine pituitary glands. *Endocrinology* 97, 102-
534 107.

535 Hornsby, P.J. and Gill, G.N. (1977) Hormonal control of adrenocortical cell
536 proliferation. Desensitization to ACTH and interaction between ACTH and fibroblast
537 growth factor in bovine adrenocortical cell cultures. *J Clin Invest* 60, 342-352.

538 Lotfi, C.F., Todorovic, Z., Armelin, H.A. and Schimmer, B.P. (1997) Unmasking a
539 growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse
540 adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem* 272, 29886-29891.

541 Lowry, P.J., Silas, L., McLean, C., Linton, E.A. and Estivariz, F.E. (1983) Pro-gamma-
542 melanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory
543 growth. *Nature* 306, 70-73.

544 Masui, H. and Garren, L.D. (1971) On the mechanism of action of adrenocorticotropic
545 hormone. The stimulation of thymidine kinase activity with altered properties and
546 changed subcellular distribution. J Biol Chem 246, 5407-5413.

547 Mattos, G.E. and Lotfi, C.F. (2005) Differences between the growth regulatory
548 pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line. Mol Cell Endocrinol
549 245, 31-42.

550 Mendonça, P.O.R.d., Lotfi, C.F.P. The proliferative effect of synthetic N-POMC1–28
551 peptides in rat adrenal cortex: A possible role for cyclin E. Mol Cell Endocrinol (2010),
552 doi:10.1016/j.mce.2010.12.012

553 Otis, M., Campbell, S., Payet, M.D. and Gallo-Payet, N. (2005) Angiotensin II
554 stimulates protein synthesis and inhibits proliferation in primary cultures of rat adrenal
555 glomerulosa cells. Endocrinology 146, 633-642.

556 Otis, M., Campbell, S., Payet, M.D. and Gallo-Payet, N. (2007) Expression of
557 extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-
558 associated functions. J Endocrinol 193, 331-347.

559 Ramachandran, J. and Suyama, A.T. (1975) Inhibition of replication of normal
560 adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin. Proc Natl Acad Sci U S A 72,
561 113-117.

562 Ramirez-Zacarias, J.L., Castro-Munozledo, F. and Kuri-Harcuch, W. (1992)
563 Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids
564 with Oil red O. Histochemistry 97, 493-7.

565 Simonian, M.H. and Gill, G.N. (1981) Regulation of the fetal human adrenal cortex:
566 effects of adrenocorticotropin on growth and function of monolayer cultures of fetal and
567 definitive zone cells. Endocrinology 108, 1769-1779.

568 Shepherd, S.P. and Holzwarth, M.A. (2001) Chromaffin-adrenocortical cell
569 interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures. *Am J*
570 *Physiol Cell Physiol* 280, C61-71.

571 Torres, T.E., de Mendonca, P.O. and Lotfi, C.F. (2010) Synthetic modified N-POMC(1-
572 28) controls in vivo proliferation and blocks apoptosis in rat adrenal cortex. *Cell Tissue*
573 *Res* 341, 239-250.

Table 1 Pro-apoptotic effect of ACTH on primary rat adrenal cell cultures

Cell Type		Apoptosis (%)		
		24 h	48 h	72 h
G cells	Control	21.0 ± 8.5	20.8 ± 5.7	24.7 ± 7.8
	ACTH 1 nM	61.5 ± 7.0***	80.9 ± 7.4***	81.1 ± 9.7***
F/R cells	Control	21.1 ± 7.3	40.2 ± 13.6	29.2 ± 5.1
	ACTH 1 nM	44.0 ± 11.5*	59.4 ± 5.3	68.3 ± 12.8***

Mean ± SD

Control = no treatment (DMEM + 0.5% FBS)

* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (treatment vs. control)

one-way ANOVA with Tukey post test

Figure

[Click here to download high resolution image](#)

Figure 1

Figure

[Click here to download high resolution image](#)

Figure 2

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 7

Figure

[Click here to download high resolution image](#)

Figure 8

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 9