SABRINA POLLI

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DOS GENES DE
RESPOSTA PRIMÁRIA, PROTEÍNAS DA FAMÍLIA *FOS* E
JUN, EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE SUPRA-RENAL DE
RATO TRATADAS COM ACTH E FGF2.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Morfofuncionais.

SÃO PAULO

2007

SABRINA POLLI

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DOS GENES DE
RESPOSTA PRIMÁRIA, PROTEÍNAS DA FAMÍLIA *FOS* E
JUN, EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE SUPRA-RENAL DE
RATO TRATADAS COM ACTH E FGF2.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Morfofuncionais.

Área de Concentração: Ciências
Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini
Pacicco Lotfi.

SÃO PAULO

2007

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sueli e Roberto e ao meu irmão Fábio pela cumplicidade;

Ao Walter S. Paes, que apesar de aparecer em minha vida apenas no final da tese, sempre me incentivou nas horas difíceis e calmas, com amor, força, companheirismo e paciência, para que eu pudesse finalizar mais esta importante etapa de minha vida. A você, que me ajuda diariamente a compreender o amor e muitas outras coisas da vida, o meu muito obrigada, sempre de coração.

Aos amigos e colegas do laboratório de Estrutura e Função celular, pelo apoio moral e técnico e pelo convívio diário: Thompson, Pedro, Carol, Marcela, Gabriele e Renato;

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional: Marcela (meu maior exemplo de dedicação), Gabriela, Maria Alicia, Guilherme, Flávio e a Prof. Dra. Maria Luiza;

A Fátima de Freitas pelo apoio e amizade;

A minha orientadora Claudimara, pela oportunidade de ser uma de suas alunas e incentivo em desenvolver esse trabalho em seu laboratório;

Aos funcionários do Depto Anatomia, do Instituto de Ciências Biomédicas –ICB3, principalmente Joelcimar, Ricardo e ao Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti;

Aos amigos do Instituto Adolfo Lutz: Mônica, Cinthya, Roberta, Vera, Tadeu, Latúlia, Andréia, Sara, Cristina, Sueli, Rosana e Marisete;

Ao Dr. Venâncio Avancini por acreditar na minha capacidade profissional e sempre me incentivar a continuar;

As Diretoras do Depto Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz, Dr^a. Marina Sueko Oyafuso e Dra. Marina Maeda, que permitiram que eu pudesse me afastar nos horários de disciplinas e experimentos;

Aos ratos do biotério.

RESUMO

POLLI, S. **Análise da expressão das proteínas dos genes de resposta primária, proteínas da família Fos e Jun, em culturas primárias de supra-renal de rato tratadas com ACTH e FGF2.** (2007) 90fl Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) ICB. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Existem evidências que o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), *in vivo*, apresenta além da sua função esteroidogênica, um papel importante no equilíbrio entre proliferação e morte celular na glândula supra-renal. As proteínas dos genes de resposta primária, dentre elas proteínas da família Fos e Jun, são componentes do fator de transcrição AP1 e dependendo de sua composição, pode estar relacionado com proliferação, diferenciação ou morte celular. Diferentes modelos experimentais têm sido utilizados para estudar a ação do ACTH na supra-renal e o sistema *in vitro*, é um deles. Nesse trabalho utilizamos culturas de células primárias de supra-renal de ratos, células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares, para avaliar por imunocitoquímica e por imunoblotting, os efeitos do ACTH e do fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) através da expressão das proteínas c-Fos, FosB, Fra1, Fra2, c-Jun, JunB e JunD, e dessa forma inferir a provável composição do complexo AP1. Os resultados deste estudo mostram que os tratamentos com ACTH e FGF2 modificam o padrão de expressão dessas proteínas, induzindo principalmente um aumento expressivo e consistente da expressão da proteína JunB nas células tratadas com ACTH, sugerindo uma composição AP1 formada por JunB/c-Fos ou FosB, que é compatível com um regulador negativo da progressão do ciclo celular. Por outro lado, tratamentos com FGF2, indicam a formação de um complexo c-Jun/c-Fos, FosB e Fra2, com características de um fator de transcrição indutor de proliferação. Esses resultados estão de acordo com os efeitos biológicos observados da ação do ACTH e do FGF2, respectivamente, inibição e proliferação celular em culturas primárias de supra-renal de rato. Em conjunto esses resultados contribuem para explicar um dos prováveis mecanismos pelo qual o ACTH é um fator anti-mitogênico em culturas de células adrenais normais.

Palavras-chave: cultura primária de supra-renal de rato, proteínas Fos e Jun, ACTH, FGF2.

ABSTRACT

POLLI, S. THE EXPRESSION OF EARLY PRIMARY GENE PROTEINS, FOS AND JUN FAMILY PROTEINS, IN RAT ADRENAL PRIMARY CULTURES TREATED WITH ACTH AND FGF2. (2007) 90fl MASTER thesis in Morphofunctionals Sciences, ICB. Universidade de São Paulo, São Paulo.

There are evidences that *in vivo* the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) displays an important role in the balance of proliferation and cellular death in the adrenal gland, besides its steroidogenic function. The early response gene proteins, among them Fos and Jun family, are components of the transcription factor AP-1 that, depending on its composition, could be related with proliferation, differentiation or cellular death. Different experimental models have been used to study the action of ACTH in the adrenal gland and the *in vitro* system is one of them. In this work we have been used adrenocortex cells of rat primary cultures, Glomerulosas and Fasciculata/Reticularis cells to evaluate, by immunocytochemistry and immunoblotting, the effects of ACTH and fibroblast growth factor (FGF2) in the expression of c-Fos, FosB, Fra1, Fra2, c-Jun, JunB and JunD proteins, and in such wise as to predict the composition of AP1 complex. The results of this study showed that ACTH and FGF2 treatments modify the expression pattern of these proteins, inducing mainly a consistent and expressive increase of JunB protein expression in the ACTH-treated cells, suggesting an AP1 composition with JunB/c-Fos or FosB, which are compatible with a negative regulator of cell cycle progression. On the other hand, FGF2 treatments indicate the composition of c-Jun/c-Fos or FosB or Fra-2 complexes, which suggest a complex related with induction of proliferation. These results are in agreement with the biological effects observed in rat adrenal primary culture treated with ACTH and FGF2, respectively, inhibition and cellular proliferation. On the whole, these results contribute to explain one of the probable mechanisms by which ACTH proceed as an anti-mitogenic factor in normal adrenal cell cultures.

Key- Word: rat adrenal culture cells, Fos and Jun proteins, ACTH, FGF2.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1 – Activator Protein 1

ATF - Activating Transcriptor Factor

BSA - Bovine Serum Albumin

Cdks - Cyclin Dependent Kinase

CKIs - CDK Inhibitors

CRF – Corticotropin-Releasing Hormone

CRFr - Corticotropin-Releasing Hormone Receptor

CRE – cAMP Response Element

CREB - cAMP Response-Element Binding-Protein

cAMP - Cyclic Monophosphate of Adenosine

DNA - Deoxyribonucleic Acid

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

ERK - Extracellular Signal-Regulated kinases

FGF2 – Fibroblast Growth Factor 2

GABA - Gamma-Aminobutyric Acid

HPA - Hypothalamus-Pituitary-Adrenal

JNK – Jun NH₂-Terminal Kinases

MAPK – Mitogen Activated Protein Kinases

MC2r – Melanocortin Receptor

PDGF - Platelet-Derived Growth Factor

P450_{scc} - Cholesterol Side-Chain Cleavage

PKA – Protein Kinase A

RNA - Ribonucleic Acid

SFB – Serum Fetal Bovine

TRE - PMA Responsive Element

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- A: Foto ilustrativa da glândula supra-renal de rato macho; B: Esquema ilustrativo da glândula supra-renal Humana; C: Corte histológico da glândula supra-renal humana; D: Foto ilustrativa do córtex histológico da supra-renal humana, demonstrando as diferentes zonas corticais e medula; C e D: Coloração por Hematoxilina-eosina.....	16
Figura 02- Diagrama do eixo HPA.....	17
Figura 03- Esquema das fases do ciclo celular.....	22
Figura 04- Esquema do fator de transcrição AP-1.....	27
Figura 05- Esquema ilustrativo do efeito dos componentes do fator de transcrição AP-1 no ciclo celular.....	28
Figura 06- Esquema ilustrativo da obtenção da cultura primária de supra-renal de ratos.....	32
Figura 07- Expressão da proteína c-Jun por imunocitoquímica em culturas primárias de células de adrenais de ratos, tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C).....	38
Figura 08- Fotomicrografia representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína c-Jun nos núcleos de células Fasciculadas/Reticulares não tratadas (A) e tratadas com 10^{-9} M ACTH por 2h (B).	38
Figura 09- Resultado representativo da expressão da proteína c-Jun por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, tratadas por 1, 2, 4 e 6 horas com ACTH 10^{-9} M ou não tratadas.	39
Figura 10- (A) Resultado representativo da expressão da proteína c-Jun por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjunto. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína c-Jun.....	40
Figura 11- Expressão da proteína JunB por imunocitoquímica em culturas primárias de células de adrenais de ratos, tratadas por 2 horas com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C).....	41
Figura 12- Fotomicrografia representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína JunB nos núcleos de células Fasciculadas/Reticulares não tratadas (A) e tratadas com 10^{-9} M ACTH por 2h (B).....	42

Figura 13- (A) Resultado representativo da expressão da proteína JunB por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína JunB.....43

Figura 14- (A) Resultado representativo da expressão da proteína JunB por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína JunB.....44

Figura 15- Expressão da proteína JunD por imunocitoquímica em cultura primária de células de adrenais de ratos, tratadas por 2 horas com ACTH 10^{-9} M , FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C).46

Figura 16- Fotomicrografia representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína JunD nos núcleos de células Glomerulosa, não tratadas (A) e tratadas com 10^{-9} M ACTH por 2h (B).....46

Figura 17- (A) Resultado representativo da expressão da proteína JunD por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína JunD.....47

Figura 18- (A) Resultado representativo da expressão da proteína JunD por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína JunD.....48

Figura 19- Expressão da proteína c-Fos por imunocitoquímica em cultura primária de células de adrenais de ratos, tratadas por 2 horas com ACTH 10^{-9} M , FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C).....50

Figura 20- Fotomicrografia representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína c-Fos nos núcleos de células Fasciculadas/Reticulares, não tratadas (A) e tratadas com 10^{-9} M ACTH por 2h (B).....51

Figura 21- (A) Resultado representativo da expressão da proteína c-Fos por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína c-Fos.....52

Figura 22- Expressão da proteína FosB por imunocitoquímica em cultura primária de células de adrenais de ratos, tratadas por 2 horas com ACTH 10^{-9} M , FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C).....53

Figura 23- Fotomicrografia representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína FosB nos núcleos de células Glomerulosas tratadas com ACTH 10^{-9} M por 2h.....	54
Figura 24– (A) Resultado representativo da expressão da proteína FosB por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (C) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína FosB.....	55
Figura 25- Expressão da proteína Fra1 por imunocitoquímica em culturas primárias de células de adrenais de ratos, tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C).....	56
Figura 26- Fotomicrografia representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína Fra1 nos núcleos de células Fasciculadas/Reticulares tratadas com ACTH 10^{-9} M por 2h.....	57
Figura 27– (A) Resultado representativo da expressão da proteína Fra1 por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína Fra1.....	58
Figura 28– (A) Resultado representativo da expressão da proteína Fra1 por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (C) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína Fra1.....	59
Figura 29- Expressão da proteína Fra2 por imunocitoquímica em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C).....	61
Figura 30- Fotomicrografia representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína Fra2 nos núcleos de células Fasciculadas/Reticulares tratadas com ACTH 10^{-9} M por 2h.....	61
Figura 31– (A) Resultado representativo da expressão da proteína Fra2 por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (C) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína Fra2.....	62
Figura 32– (A) Resultado representativo da expressão da proteína Fra2 por Western Blotting em culturas primárias de adrenais de ratos, não tratadas (C) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína Fra2.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Proteínas da família Jun estão expressas nas culturas de células de supra-renal de rato após diferentes tratamentos.....49

Tabela 02- Proteínas da família Fos estão expressas nas culturas de células de supra-renal de rato após diferentes tratamentos..... 64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Obtenções das culturas Primárias de células da supra-renal de Rato	31
3.2 Tratamentos das culturas primárias de células de supra-renal de rato	33
3.3 Experimentos de Imunocitoquímica	33
3.4 Análise dos resultados de Imunocitoquímica	34
3.5 Obtenção do lisado celular	35
3.6 Experimentos de Western Blotting	35
3.7 Análise dos resultados de Western Blotting	36
4 RESULTADOS	
4.1 A análise da expressão da proteína c-Jun	
4.1.1 A análise por reação imunocitoquímica	37
4.1.2 A análise da proteína por Western Blotting	39
4.2 A análise da expressão da proteína JunB	
4.2.1 A análise por reação imunocitoquímica	41
4.2.2 A análise da proteína por Western Blotting	42
4.3 A análise da expressão da proteína JunD	
4.3.1 A análise por reação imunocitoquímica	45
4.3.2 A análise da proteína por Western Blotting	47
4.4 A análise da expressão da proteína c-Fos	
4.4.1 A análise por reação imunocitoquímica	50
4.4.2 A análise da proteína por Western Blotting	51
4.5 A análise da expressão da proteína FosB	
4.5.1 A análise por reação imunocitoquímica	53
4.5.2 A análise da proteína por Western Blotting	54
4.6 A análise da expressão da proteína Fra1	
4.6.1 A análise por reação imunocitoquímica	56
4.6.2 A análise da proteína por Western Blotting	57
4.7 A análise da expressão da proteína Fra2	
4.7.1 A análise por reação imunocitoquímica	60
4.7.2 A análise da proteína por Western Blotting	62

5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição anatômica das glândulas supra-renais foi feita por Eustachius em 1563 e sua importância funcional foi demonstrada inicialmente por Addison em 1855. As glândulas supra-renais estão situadas na cavidade abdominal, são órgãos retroperitoniais e estão anexas aos pólos superiores dos rins. É composta histologicamente por dois tecidos distintos, o córtex, 90% de sua massa, e a medula. Esses dois tecidos podem ser considerados dois órgãos distintos, unidos topograficamente, que apresentam morfologia, embriologia e funções diferentes.

A medula é de origem neuroectodérmica, e tem como função sintetizar catecolaminas, liberadas geralmente em grandes quantidades após fortes reações como estresse, dor, frio, calor e através de estímulos nos nervos simpáticos pré-ganglionares.

As células da camada cortical são de origem mesodérmica, formada por três tipos celulares que a divide em três zonas concêntricas denominadas de zona Glomerulosa, zona Fasciculada e zona Reticulada. São mantidas por uma cápsula de tecido conjuntivo, e seu estroma é representado por uma intensa trama de fibras reticulares que mantém as células e a organização do órgão (ARNOLD, 1866; MCNICOL, 1992). Este tecido conjuntivo envia trabéculas que penetram no córtex e acompanham vasos e nervos até a medula. A zona localizada logo abaixo da cápsula fibrosa que envolve a glândula é a zona Glomerulosa e suas células estão dispostas em pequenos grupos paralelos cuja disposição deu origem ao nome desta zona. As células que a constituem são cilíndricas, de núcleos esféricos e citoplasmas acidófilos, contendo grânulos basófilos e gotículas de lipídios. Essas células produzem e secretam aldosterona, um mineralocorticoide, que age na regulação da homeostase dos eletrólitos, principalmente sódio (Na) e potássio (K), que exerce o seu efeito principalmente nos túbulos contorcidos distais e ducto coletor do néfron, mas também na mucosa gástrica, glândulas salivares e sudoríparas. A produção da aldosterona encontra-se sob influência do sistema renina-angiotensina e do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH).

A zona seguinte, mais interna, é denominada Fasciculada e constitui praticamente 80% da glândula supra-renal normal. As células desta zona são

poliédricas e de citoplasma levemente basófilo, contendo um grande número de lipídeos, em sua maioria colesterol, ésteres de colesterol e lipídeos não-saturados. São também denominadas células claras, devido à quantidade de lipídeos, e são denominadas Fasciculadas por comporem cordões ou fascículos de células, arranjados radialmente, contendo normalmente duas colunas de células separadas por capilares adjacentes. Estas células secretam glicocorticóides, como o cortisol em humanos e corticosterona em roedores, sob a regulação do ACTH hipofisário, que por sua vez se encontra regulado pelo fator liberador de corticotropina (CRF). Ambos são regulados por retro alimentação negativa pelos glicocorticóides.

A zona Fasciculada termina abruptamente na estreita zona Reticulada, a zona mais interna da glândula supra-renal. Suas células são arranjadas em pequenos alvéolos, separadas por capilares de paredes finas com aspecto de rede. São pobres em lipídeos, apresentam citoplasma eosinófilo e também são conhecidas como células compactas. Secretam andrógenos como a dehidroepiandrosterona (DHEA e sulfato de DHEA).

No homem os suprimentos arteriais da glândula adrenal derivam da aorta, das artérias frênicas inferiores e das artérias renais, que ao chegarem ao órgão se ramificam formando capilares que percorrem toda a espessura do córtex. Já a drenagem venosa é feita por veias que drenam para veias renais. A glândula supra-renal apresenta as mesmas características morfológicas no rato e no homem; no entanto, há uma diferença anatômica no suprimento sangüíneo: no rato, a artéria supra-renal superior advém da aorta, a inferior da artéria renal, e a média está ausente. Os vasos linfáticos acompanham os grandes vasos sangüíneos e terminam nos linfonodos lombares. A inervação dessa glândula é realizada por ramos oriundos dos plexos celíacos e renais. (POPEŠKO, REJTOVÁ e HORÁK, 1992). A morfologia descrita da glândula supra-renal, esta ilustrada na Figura 01.

Figura 01: **A:** Foto ilustrativa da glândula supra-renal de rato macho; **B:** Esquema ilustrativo da glândula supra-renal humana; **C:** Corte histológico da glândula supra-renal humana; **D:** Foto ilustrativa do córtex histológico da supra-renal de rato, demonstrando as diferentes zonas corticais e medula; **C e D:** Coloração por Hematoxilina-eosina. (M: Medula; ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada e ZR: zona reticulada).

FONTE: A: Atlas de dissecação de vertebrados:

B e C: Atlas humano

D: Torres TE e Lotfi CF. 2007

A função básica da glândula supra-renal é manter a homeostase do organismo, isto é, a manutenção das condições ideais, pois uma grande variedade de estímulos, fisiológicos e patológicos, provoca alterações no eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (eixo HPA) (Figura 02). A liberação de corticosterona e do cortisol pelo córtex adrenal, é controlada exclusivamente por este eixo através do fator CRF, produzido por células do núcleo paraventricular do hipotálamo, que por sua vez estimula a liberação de ACTH. A síntese de esteróides, no córtex da supra-renal é estimulada pelo ACTH e na sua ausência, a secreção adrenocortical praticamente cessa, podendo ser fatal ao indivíduo, com exceção para aldosterona, cuja secreção é influenciada principalmente pela Angiotensina II.

Figura 02: Diagrama do eixo HPA, descrevendo a regulação e a retroalimentação positiva do cortisol por via dos receptores de glicocorticóides (RGs) e mineralcorticóides (RM).

Os glicocorticóides interagem com seus receptores em múltiplos tecido-alvos, incluindo o eixo HPA, onde é responsável pela inibição, quando existem altas concentrações de corticosteróides naturais ou dexametasona, um corticosteróide sintético presente na corrente sanguínea, de maneira que, por efeito de uma retroalimentação negativa, este corticosteróide chega ao hipotálamo e a adeno-hipófise e inibe a produção, respectivamente, do CRF e do ACTH (AGUILERA, 1994).

O ACTH ou corticotropina é um peptídeo composto por 39 aminoácidos, gerado pela clivagem da pró-opiomelanocortina (POMC), cujo processamento seqüencial, no homem, também dá origem a outros subprodutos que são secretados para o plasma (WHITE e GIBSON, 1998). A molécula POMC é uma glicoproteína precursora de 32 KDa que está localizada na hipófise produzindo vários outros hormônios peptídicos com funções diversas. Além do ACTH, o processamento e clivagem da POMC produzem a lipotropina (LPH), hormônio estimulador de melanócitos (MSHs), beta-endorfina (β -END) e peptídeos N-terminais de diferentes tamanhos como a N-POMC₁₋₇₆, produzida no lobo anterior da hipófise, que por sua vez pode sofrer uma clivagem produzindo a N-POMC₁₋₄₉ e outros peptídeos.

O ACTH tem como função principal a estimulação endócrina da glândula supra-renal e está envolvida na manutenção do córtex da supra-renal. É produzido e secretado pela região anterior da hipófise a partir de estímulos hipotalâmicos, representados pelo peptídeo CRF que se liga e ativa os receptores específicos na hipófise (receptor do fator liberador de corticotropina - CRFr). Este hormônio é armazenado e chega à hipófise por meio de um sistema porta-hipofisário, e na adeno-hipófise se liga aos receptores de membrana celular, acoplados a proteína G, aumentando assim os níveis intracelulares de AMP cíclico e de influxo de cálcio.

O mecanismo pelo qual o ACTH estimula as células adrenocorticais a produzirem esteróides, envolve a translocação do colesterol para o interior da mitocôndria, onde a proteína de membrana interna da mitocôndria (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, se dirigem para o retículo endoplasmático onde são convertidos em desoxi-corticosterona (roedores) e desoxi-cortisol (humanos, bovinos e

suínos). Estes retornam para a matriz mitocondrial e dão origem a corticosterona e cortisol, respectivamente, pela ação da enzima 11 β - Hidroxilase (P450_{11 β}) (OGISHIMA *et al*, 1989). Já a ação tardia do ACTH na regulação da esteroidogênese deve-se à capacidade deste hormônio em regular a expressão gênica das enzimas esteroidogênicas (MOORE e MILLER, 1991).

O receptor do hormônio ACTH é o MC2R integrante da família de receptores de melanocortina. É uma proteína transmembrânica de sete hélices acoplada à proteína heterotrimérica ligada a guanosina trifosfato-GTP (proteína G), que ativada aumenta a concentração intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) através da enzima adenilato ciclase. O cAMP, sendo um segundo mensageiro, ativará a via proteína quinase dependente de cAMP (via PKA) que irá promover mudança no padrão de expressão gênica das células, de maneira a promover a esteroidogênese (SIMPSON e WATERMAN, 1998) e a manutenção da glândula supra-renal (VINSON, 2003).

O ACTH é considerado um hormônio mitogênico *in vivo*, pela correlação entre os níveis de ACTH circulante e a alteração do tamanho da glândula supra-renal (NEW, 1998). A insuficiência da glândula supra-renal, como a doença de Addison, caracterizada pela insuficiência do nível sanguíneo dos hormônios adrenais leva a uma atrofia no córtex da supra-renal, principalmente na zona Fasciculada (WESTPHAL *et al.*, 1999), desestabilizando o equilíbrio entre proliferação e morte celular, importante para a manutenção da integridade do órgão. Além disso, a administração de ACTH em ratos hipofisectomizados apresenta como resposta a hipertrofia do córtex da supra-renal (KIMURA, 1969; PURVIS *et al.*, 1973). Estudos realizados em animais hipofisectomizados e tratados com ACTH devolveram o tamanho e o peso da glândula, sugerindo que o ACTH *in vivo* é um fator que controla o crescimento e a proliferação do córtex da supra-renal (IMAI *et al.*, 1990; CARSIA *et al.*, 1996). Outros resultados sugerem que o ACTH, além de mitogênico, pode ser um fator de sobrevivência importante da supra-renal, pois bloqueia apoptose *in vivo* (WYLLIE *et al.*, 1973; CARSIA *et al.*, 1996). Resultados do nosso laboratório mostram que o ACTH é o maior estímulo mitogênico para o córtex adrenal *in vivo* (TORRES e LOTFI, 2007).

Experimentos realizados *in vitro* em células tumorais de camundongo, linhagem Y1 (YASUMURA, 1966), mostraram que o ACTH₁₋₃₉ sintético tem um duplo efeito no

ciclo celular, podendo apresentar um efeito mitogênico fraco e um efeito anti-mitogênico forte. Tratamentos em pulso de até duas horas estimulam a entrada em fase S do ciclo celular, enquanto tratamentos sustentados, isto é, de mais de quatro horas inibem a entrada na fase S (LOTFI *et al.*, 1997). No entanto, o efeito mitogênico do ACTH nessa linhagem é fraco, no máximo de duas vezes o número de células em fase S em relação ao controle em comparação ao tratamento com fator de crescimento de fibroblasto (FGF2), cujo efeito mitogênico é cinco vezes maior.

Como consequência das respostas antagônicas observadas da ação do ACTH *in vivo* e *in vitro*, Hornsby (1984) sugeriu que o ACTH pode ser um mitogênico indireto. De fato, esse paradigma encontrado entre a ação *in vivo* e *in vitro* do ACTH sugere que o ACTH pode ter uma ação mitogênica indireta, e que outros fatores parácrinos como fatores de crescimento podem influenciar na manutenção do córtex da supra-renal (VIARD *et al.*, 1992; HO e VINSON, 1997).

Os fatores de crescimento peptídicos são polipeptídios biologicamente ativos relacionados ao controle da proliferação, diferenciação, sobrevivência celular, quimiotaxia, adesão celular e migração (BÖTTCHER e NIEHRS, 2005). Dentre estes fatores um dos mais importantes são as famílias de fatores de crescimentos de fibroblastos (FGFs), com 23 peptídeos descritos até o momento, que são estruturalmente correlacionados e cuja expressão e função biológica estendem-se a uma série de células e tecidos incluindo o córtex da supra-renal (FEIGE *et al.*, 1998).

Os FGFs apresentam como mecanismo de ação, a ativação de vias sinalizadoras intracelulares, através da ligação inicial a um receptor de membrana (SPORN e ROBERTS, 1985; LAZAR-MOLNAR *et al.*, 2000). Os primeiros FGFs foram descritos e obtidos a partir de extratos hipofisários e caracterizados segundo sua atividade mitogênica em células estabelecidas de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 (ARMELIN, 1973), e em culturas primárias de adrenocórtex bovina (GOSPODAROWICZ, 1975). Inicialmente foram caracterizados dois tipos de FGFs: o FGF-a (ácido) ou FGF-1, e FGF-b (básico) ou FGF-2 (GAMBARINI e ARMELIN, 1982). O gene para FGF2, assim como todos os componentes da família de FGFs, foram descritos como sendo composto por 3 exons, separados por introns bastante extensos (16 e 17,5 Kb) e as principais funções biológicas atribuídas ao FGF2 são angiogênese,

processos de reparo de lesões, regeneração de tecidos e diferenciação celular (FOLKMAN e KLAGSBRUN, 1987).

Yayon e colaboradores (1991) demonstraram que a ligação de FGF ao seu receptor necessita de heparan sulfato. Este complexo glicosaminoglicano normalmente encontra-se ligado a proteínas formando os proteoglicanos, que se localizam tanto na membrana como na matriz extracelular. A família dos receptores de FGFs é do tipo tirosina quinase, e que uma vez ligado a esse receptor desencadeia uma cascata de fosforilação intracelular. Este receptor está associado à proteína Ras e a via clássica de ativação do receptor de FGF é a proteína quinase ativada por mitogênicos (MAPK). Os receptores de FGFs correspondem a uma família de cinco genes descobertos até o momento e os mais importantes para a sinalização intracelular consistem em *flg* (FGFR1), *bek* (FGFR2), *flg-2* (FGFR3) e FGFR4 (POWERS, 2000). Cada um deles possui uma organização genômica bastante complexa, mas similar entre si, em relação aos introns e exons que os compõem, com pelo menos três sítios de poliadenilação e um processamento alternativo contido no exon 3. Resultados de nosso laboratório mostraram que o FGF2 é capaz de ativar as vias ERK1/2 nos dois tipos celulares estudados, células Glomerulosa e Fasciculada/ Reticulada, de forma robusta, mas transiente, por um mecanismo que pode ser regulado pela via PKA (MATTOS e LOTFI, 2005).

Quando hormônios e fatores de crescimento se ligam aos receptores específicos eles iniciam uma cascata de sinalização, por fosforilação, que tem por finalidade, alterar a expressão de genes específicos e podem definir, dentre outros fenômenos, se as células irão ou não proliferar. Didaticamente o ciclo celular consiste numa série de eventos coordenados que levam a célula a iniciar o processo de divisão celular, de maneira que cada um dos eventos corresponde à ativação de respostas específicas, que caracterizam as diferentes fases do ciclo celular. A mitose e a citocinese em conjunto constituem períodos muito breves, chamados de fase M. O intervalo entre duas mitoses, chamado de interfase, pode ser compreendido como uma série de eventos preparatórios, dividindo-o em 4 fases (G0, G1, S e G2) (Figura 03). No entanto, para que o ciclo seja iniciado, uma seqüência ordenada de eventos necessita ocorrer, determinando o processo de divisão.

Figura 03: Esquema das fases do ciclo celular

A Fase G1 é o período em que a célula está se preparando para o início da síntese de DNA, caracterizada por pronunciada síntese de RNA. Durante esse percurso existe, no final dessa fase, um ponto de restrição (R1) que pode interromper o ciclo celular, se os eventos anteriores não se completarem (DUBRAVKA e SCOTT, 2000; BLAGOSKLONNY e PARDEE, 2002). Estes pontos podem ser regulados por sinais extracelulares, podendo promover ou inibir a proliferação celular. Portanto, agentes mitogênicos, como fatores de crescimento ou hormônios, são importantes para a progressão das células no ciclo celular. Estes sinais chegam ao núcleo das células pela ativação de vias de sinalização intracelular e uma vez iniciada a cascata de sinalização, ocorre a expressão de genes de resposta primária, que constituem a primeira onda de transcrição gênica, independente de síntese protéica.

A maioria dos genes de resposta primária codifica proteínas cuja função é regular a transcrição gênica sendo, portanto, fatores de transcrição importantes para o desencadeamento de estímulos para a saída de G0 e entrada em G1 do ciclo celular (PARDEE, 1989; SCHEER, 1994). Estas proteínas parecem garantir o padrão de expressão diferencial de outros genes, os de resposta secundária, cujos principais

representantes consistem em ciclinas, sintetizadas somente em fases específicas. As ciclinas se ligam a quinases específicas (Cdks) presentes durante todo o ciclo celular, formando um complexo ciclina/CDK que proporcionam as condições necessárias para que a célula progrida no ciclo celular. (HERSCHMAN, 1991).

Se as condições extracelulares não forem favoráveis, as células retardam o avanço em G1 e podem entrar em um estado quiescente conhecido como Fase G0. Esta fase não se interpõe às fases do ciclo, mas é um anexo da interfase. Este estado quiescente pode ser experimentalmente induzido em linhagens celulares. Após a passagem deste ponto, as células estão preparadas para síntese de DNA propriamente dita, chamada de Fase S, onde a célula torna-se capaz de sintetizar DNA (PARDEE, 1974). Após a síntese de DNA a célula inicia a preparação para a mitose, correspondente a Fase G2, onde a célula apresenta conteúdo duplicado de material genético. Nessa etapa ocorre outro importante ponto de restrição (R2), com a ativação da proteína p53 responsável por detectar erros de replicação e material genético não duplicado.

A fase M consiste da divisão celular propriamente dita, caracterizada pela condensação e segregação dos cromossomos e pela desorganização da estrutura do envelope nuclear. Após a segregação dos cromossomos, a membrana nuclear é novamente organizada e ocorre a citocinese, que é a divisão do material citoplasmático.

Dentre os fatores de transcrição estão em destaque as proteínas que constituem o fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP-1) (KOVARY e BRAVO, 1992). O fator de transcrição AP-1 é um complexo dimérico e é formado por membros das famílias Jun e Fos, dentre outros, como ativador de fator de transcrição (ATF) e músculo aponeurótico fibrosarcoma (MAF) (SHAULIAN e KARIN, 2001). As principais proteínas que compõem AP-1 em células de mamíferos são as proteínas Fos e Jun (EFERL e WAGNER, 2003). Estas proteínas interagem umas com as outras, através de um domínio rico em resíduos de leucinas, composto por sete aminoácidos. Desse modo se alinham ao longo de uma face localizada na região C terminal destas proteínas, formando dímeros na forma de α hélice, através do que se denomina “zíper de leucina”. A cadeia lateral da leucina estende-se para o domínio helicoidal de Fos interagindo com a hélice de Jun promovendo a dimerização, e pode formar tanto homodímeros (apenas

Jun/Jun), quanto heterodímeros (Jun/Fos). Jun pode ainda ligar-se a proteínas de outras famílias como a proteína CREB (HERSCHAMAN, 1991).

A família Jun é composta por três membros: as proteínas c-Jun, JunB e JunD. Cada um destes membros tem um papel importante e distinto no controle do crescimento celular (BRAVO, 1990).

O primeiro membro da família Jun identificado foi a seqüência do oncogene v-jun no Avian Sarcoma Vírus (ASV 17), encontrado em um sarcoma espontâneo de galinhas adultas (VOGT, 2001), e em seguida, seu correspondente celular o proto-oncogene c-jun (CAVALIERI *et al*, 1985). Citocinas, fatores do crescimento, estresse ambiental, infecções bacterianas, virais, e oncogenes ativam c-jun e induzem sua expressão em vários tipos celulares.

O gene c-jun está expresso durante toda organogênese (WILKINSON *et al*., 1989) e codifica dois RNA mensageiros, um de 2,7 Kb e outro de 3,2 Kb. A proteína c-Jun apresenta uma isoforma de peso molecular de aproximadamente 39 KDa e sua expressão é menos transitória do que a expressão de Fos (BRAVO, 1990), mas sua superexpressão está relacionada em humanos com tumores de pele e fígado. (YOUNG *et al*, 1999).

A proteína c-Jun é indispensável para a célula, pois regula a expressão da ciclina D1 que é um regulador positivo do ciclo celular e regula a expressão da proteína p53 que é um regulador negativo do ciclo celular (JOCHUM *et al*., 2001). Homodímeros formados por c-Jun exibem uma forte atividade de transcrição, enquanto que fatores de transcrição formados pelos outros membros da família, JunD e principalmente JunB, formam fatores de transcrição fracos e podem reprimir a atividade de c-Jun (EFERL e WAGNER, 2003). Um dos maiores alvos da cascata de sinalização da proteína quinase Jun-N-terminal (JNK), membro da superfamília das proteínas quinases ativadas por mitogênos (MAPKs), é a ativação do fator de transcrição AP-1 (WESTON e DAVIS, 2002). Dímeros de JNKs ativas passam pelo envelope nuclear e são os 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, Elk1, Myc, Smad3. A fosforilação de c-Jun (Ser63, Ser73 e Thr91 e Thr93) leva a um aumento da atividade transcricional, um aumento na expressão de c-Jun e recrutamento da proteína

CREB. A proteína JNK também fosforila outras proteínas de AP-1 como: JunB e JunD. Acredita-se que diferentes respostas biológicas, como apoptose e proliferação, dependam da manutenção, ou não, da atividade transcricional da proteína da família Jun na forma fosforilada (DAVIS *et al*, 2000).

A proteína JunB, também foi identificada a partir de uma sequência do oncogene v-jun no Avian Sarcoma Vírus (ASV 17) (RYDER *et al*, 1988), e tem grande homologia com a proteína c-Jun, mas sua função biológica difere quanto a capacidade de ativar a transcrição, exercendo papel oposto. O aumento da expressão da proteína JunB reduz a proliferação aumentando a fase G1 do ciclo celular e a expressão da proteína p16, que inibe a atividade da ciclina D1 (JOCHUM *et al.*, 2001).

Hirai e colaboradores (1989) descreveram um terceiro membro desta família, a proteína JunD, que está relacionada com inibição de proliferação e a manutenção das células na fase G0 do ciclo celular.

O termo fos (sarcoma osteogênico de Finkel) foi primeiramente usado para descrever o oncogene descoberto por Finkel-Birkis-Junkel, no vírus causador de sarcoma osteogênico e um vírus neuroblastoma aviário (FINKEL *et al*, 1966). A sequência celular normal que originava v-fos, oncogene viral, é referida como proto-oncogene celular Fos (CURRAN, 1983). A família Fos é composta por quatro membros: c-Fos, FosB, Fra1 e Fra2.

O gene c-fos tem sido muito utilizado como marcador de proliferação e de resposta a vários agentes mitogênicos, pois sua expressão gênica é rápida e transiente, e ocorre em resposta a fatores de crescimento, de diferenciação ou ao estresse (CURRAN, 1988). Resultados da observação da atividade do gene c-fos em culturas de fibroblastos de camundongo mostraram que a sua transcrição ocorre com 5 minutos, de maneira que o mRNA (RNA mensageiro) se acumula e se mantém por 30-45 min após a estimulação, enquanto a síntese da proteína c-Fos permanece por 2h e começa a declinar (MULLER *et al.*, 1984). No sistema nervoso a expressão da proteína c-Fos determina níveis de atividade neuronal (HOFFMAN e LYO, 2002), enquanto estudos *in vitro* associam a expressão de c-Fos, FosB e Fra2 com processos tumorais (SCHUERMANN, 1991). Quando super expresso em camundongos c-Fos provoca a formação de osteosarcoma pela transformação de condroblastos e osteoblastos,

relacionando a indução de c-Fos com esse tipo de tumor (WANG *et al.*, 1991). O gene c-fos compreende quatro exons e três introns, e codifica para uma proteína nuclear de 62 KDa, ativada por fosforilação.

A proteína FosB foi isolada de uma biblioteca de cDNA (DNA complementar) correspondente a mRNAs induzidos por fatores de crescimentos em linhagem estabelecida de fibroblastos de camundongo a NIH3T3. Este gene codifica um RNA mensageiro de 5,1 Kb, apresenta peso molecular de 34KDa e é uma proteína de 338 aminoácidos que possui uma grande homologia com c-Fos, principalmente nas regiões do zíper de leucina e da ligação do DNA (ZERIAL *et al.*, 1989). A cinética de indução deste gene é muito semelhante à de c-fos e o produto de FosB atua na fase G1 do ciclo celular e está relacionada ao sistema nervoso, atuando como papel importante em comportamentos compulsivos.

Zajchowski e colaboradores (2001) localizaram as proteínas Fra1 e Fra2 não apenas no núcleo das células mas também no citoplasma. Fra1 codifica um RNA mensageiro de aproximadamente 1,7 – 1,8 Kb e apresenta peso molecular de 43KDa. Células quiescentes não possuem níveis detectáveis de seu RNA mensageiro, entretanto estes níveis se elevam 30 min. após o estímulo com fatores de crescimento (COHEN e CURRAN, 1988).

A proteína Fra2 foi reconhecida como uma proteína de peso molecular de 42 KDa, e está relacionada com processos tumorais. Similar aos outros membros desta família, o gene fra2 apresenta 4 exons e 3 introns, codificando um mRNA de aproximadamente 5,7 – 6,8 Kb. Sua expressão gênica é rápida, em torno de 1 hora (FOLETTA, 1996).

O complexo AP-1 (Figura 04) foi caracterizado pela sua habilidade em alterar a expressão de genes promotores de tumores em resposta a fatores de crescimento (ANGEL e KARIN, 1991). Após serem induzidos, estes dímeros reconhecem e se ligam a seqüências específicas de DNA (TGAC/GTCA) denominada elemento de resposta ao PMA (TRE) que é encontrado em promotores de muitos genes, incluindo aqueles que são reguladores do ciclo celular, como ciclina D1. Além disso, Jun forma dímeros com outras proteínas bZIP, como a família ATF, que se ligam a uma outra região do DNA (5' TGACGTCA 3') denominada elemento de resposta ao cAMP (CRE). A afinidade de

ligação a certa seqüência TRE ou CRE é determinada pelas diferentes combinações do dímero AP-1 e talvez o mais importante pelas seqüências vizinhas a ele (RYSECK e BRAVO, 1991). Além disso, as proteínas da família Jun e Fos possuem domínios de ativação transcricionais que são fosforilados por MAPKs. No entanto, pode haver modificações no nível de fosforilação dessas proteínas (Fos e Jun) que sugerem aumento de atividade ou afinidade do complexo AP-1 (WISDOM, 1999).

Figura 04: Esquema do fator de transcrição AP-1

Portanto este fator de transcrição pode ser formado por diferentes combinações de dímeros que determinam o gene que será regulado por AP-1 (KARIN e HUNTER, 1995). Finalmente, como a expressão das proteínas Fos e Jun são temporalmente coordenadas em função dos vários estímulos, a composição de AP-1 pode mudar na célula em função do estímulo e tempo de estimulação. Dependendo dos componentes que formam o dímero AP-1, diferentes genes, por ele regulados, são induzidos, definindo assim o efeito biológico, que no caso do fator de transcrição AP-1 pode ser proliferação, diferenciação ou apoptose (Chinenov e Keippola, 2001).

Todos esses fatores contribuem para que AP-1 seja um fator de transcrição versátil e dinâmico capaz de responder a diferentes estímulos. Esses dados sugerem que as proteínas Fos e Jun e, portanto o complexo AP-1, podem ser necessários para desencadear a mudança do padrão de expressão gênica requerida para a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ (Figura 05), indicando a ação provável dos fatores que estimularam sua formação.

Figura 05: Esquema ilustrativo do efeito dos componentes do fator de transcrição AP-1 no ciclo celular

Vários estudos, *in vivo* e *in vitro*, foram realizados para avaliar a expressão dos genes de resposta primária, membros da família Jun e Fos, no córtex da supra-renal. Yang e colaboradores (1989) realizaram estudos *in vivo* utilizando ratos submetidos à imobilização para induzir estresse, e observaram a inibição da expressão da proteína c-Fos. Em 1990, este mesmo grupo mostrou um aumento da expressão da proteína c-Fos, após administração do hormônio ACTH.

Imai e colaboradores (1990) analisaram os genes de resposta primária, utilizando ratos hipofisectomizados e tratados com ACTH e observaram uma recuperação do tamanho e do peso da glândula, sugerindo que o ACTH *in vivo* é um fator que controla o crescimento e a proliferação do córtex da supra-renal. Em 1992, Pennypacker e colaboradores analisaram a constituição do fator de transcrição AP-1, na adrenal de ratos submetidos a tratamentos com nicotina (estresse) e observaram que o complexo AP-1 pode ser localizado tanto na medula como no córtex da supra-renal.

Em 1995, Lehoux e Ducharme estudaram o efeito do hormônio ACTH através da análise dos níveis de mRNA das proteínas c-Jun, JunB, c-Fos e FosB nas diferentes zonas das supra-renais de ratos, e demonstraram que os níveis destas proteínas aumentam após 30 minutos do estímulo com ACTH. No ano seguinte, Smith e Carter relacionaram a atividade do complexo AP-1, na adrenal de ratos, com a atividade do receptor de glicocorticóide.

Kimura e colaboradores em 1993, utilizando linhagem Y1, mostraram que o ACTH é capaz de modular a expressão dos genes e das proteínas Fos e Jun, sugerindo que o fator de transcrição AP-1 pode ter um papel no mecanismo de ação do ACTH.

Armelin e colaboradores em 1996 relacionaram a expressão destes genes com as vias de sinalização PKA e PKC e com a regulação de proliferação. Em 2001, Lotfi e Armelin, utilizando linhagem tumoral de supra-renal de caudomongo, a Y1, mostraram que a presença da proteína c-Fos está relacionada com proliferação celular nessas células, sugerindo que c-Fos poderia ser um marcador de proliferação. No entanto, mesmo sendo importantes para este passo no ciclo os membros da família Fos não são considerados essenciais, pois culturas de fibroblastos, que não expressam estas proteínas, continuam a proliferar (HU *et al.*, 1994).

Estudos realizados *in vitro* pelo grupo de Viard, em 1992, isolando células de supra-renal de bovinos e ovinos, analisaram a regulação do RNA mensageiro das proteínas c-Fos, c-Jun e JunB, na ação esteroidogênica do ACTH e da Angiotensina II, evidenciando o papel do ACTH na regulação da expressão destes genes. Pesquisas realizadas com células da linhagem Y1 estimuladas com ACTH mostraram que este hormônio inibe c-myc na transição de G1 para S e provoca alterações no citoesqueleto das células (KIMURA *et al.*, 1988; ARMELIN *et al.*, 1996).

2 OBJETIVOS

Dada a importância da ação do ACTH na manutenção do córtex da supra-renal e da constituição do complexo AP1 como modulador da resposta biológica, utilizamos culturas primárias de células da supra-renal de rato para:

- Determinar a ação do ACTH, do FGF2 e a interação entre ambos através da análise da expressão das proteínas das famílias Jun e Fos, nas células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares, utilizando ensaios de Imunocitoquímica e Western Blotting.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenções de culturas Primárias de células da Supra-renal de Rato

Os procedimentos utilizados para obtenção das culturas primárias foram aprovados pela Comissão de Ética, declaração CEEA 023.2005. O protocolo de obtenção das culturas primárias de supra-renal de rato (Figura 06), células isoladas da zona Glomerulosa e células isoladas da zona Fasciculada e Reticulada, está estabelecido. As células foram caracterizadas conforme descrito em Mattos e Lotfi, (2005), através de experimentos de Imunocitoquímica para a proteína P450ald, onde somente as células isoladas da Glomerulosa expressaram esta proteína, confirmando a separação dos dois tipos celulares.

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley machos pesando entre 250-300g, que foram sacrificados por decapitação no período da manhã. Após o abdome ter sido rapidamente aberto, as supra-renais foram retiradas com o auxílio de uma pinça, juntamente com a camada de gordura que as envolve. As glândulas retiradas dos animais foram mantidas em uma placa de Petri contendo meio de cultura DMEM (Gibco BRL Products, Grand Island – USA) com antibióticos (25 g/ml ampicilina e 100 g/ml estreptomicina). Após serem lavadas em PBSA as gorduras foram retiradas e as glândulas foram mantidas em DMEM antes de serem dissecadas. Em seguida, as glândulas foram descapsuladas separando-se assim, com a cápsula, as células da zona Glomerulosa (G) do restante da glândula. No restante da glândula temos a zona Fasciculada, Reticulada e a Medula, esta última não sobrevive após o plaqueamento, restando, portanto as células da zona Fasciculada e Reticulada (F/R). Os fragmentos obtidos foram submetidos à digestão enzimática, sendo transferidos para tubos cônicos contendo meio de cultura DMEM (1ml /rato), colagenase (Gibco BRL Products, Grand Island – USA), (2mg / ml / rato para as células G e 4mg /ml / rato para as células F/R) e desoxiribonuclease I (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis - USA), (2 µg /ml /rato), e incubados em tempos distintos a 37 °C e 5%CO₂ (células G por 20 min e células F/R por 40min). Após a dissociação enzimática, as duas soluções contendo as células foram dissociadas mecanicamente, com o auxílio de uma pipeta graduada, através de movimentos suaves e repetidos de aspiração (aproximadamente 40 vezes). Em seguida, a suspensão de células foi filtrada em uma membrana de Nylon 100 µm

(Millipore, Billerica - USA), para retirada de material não digerido. Essa suspensão de células teve seu volume final aumentado com meio de cultura para um total de 45ml, diluindo assim a concentração da collagenase. As suspensões de células foram centrifugadas por 12 min a 700 rpm, a temperatura ambiente, e o “pellet” de células formado foi diluído em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram plaqueadas numa concentração $2-3 \times 10^4$ células/lamínula em um par de lamínulas de 13mm/tratamento, que são especiais para cultura de células primárias (Nalge Nunc International, Naperville - USA) e foram utilizadas nos experimentos de imunocitoquímica. Para experimentos de Western Blotting as células foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro, especiais para culturas de células primárias (Falcon, Franklin Lakes - USA) numa concentração de $1-2 \times 10^6$ células/placa. As células foram mantidas a 37°C em incubadora úmida com 95% de ar e 5% de CO₂. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram carenciadas para soro utilizando o meio de cultura DMEM contendo 0,5% de SFB, por mais 24h, quando foram estimuladas pelos diferentes fatores.

Figura 06: Esquema ilustrativo da obtenção das culturas primárias de supra-renal de ratos

3.2 Tratamentos das culturas primárias de células de supra-renal de rato

Para o estabelecimento da dependência de dose em função do estímulo utilizado, as células foram estimuladas, depois de carenciadas para soro, por diferentes concentrações de ACTH₁₋₃₉, nas concentrações fisiológicas de 10^{-12} , 10^{-10} e 10^{-9} M e concentração farmacológica 10^{-7} M, por 2h. Para o estudo da cinética de expressão das proteínas em função do tempo de tratamento, foi escolhida a concentração de 10^{-9} M e as células foram estimuladas por diferentes tempos (1h, 2h, 4h e 6h).

Após o carenciamento, as células foram tratadas com ACTH₁₋₃₉ (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis - USA) na concentração de 10^{-9} M, ou FGF2 (fator de crescimento de fibroblasto básico bovino recombinante, doado pelo Professor Ângelo Gambarini - IQ-USP) na concentração de 20 ng/ml, ou tratamentos combinados de ACTH 10^{-9} M + FGF2 20 ng/ml, ou ainda, não estimuladas (controle), durante 2 horas. As concentrações do ACTH e FGF2 e tempo de tratamento utilizadas foram anteriormente estabelecidas e otimizadas nas culturas de células da linhagem Y1 (ARMELIN et al., 1996 e LOTFI et al., 1997).

3.3 Experimentos de Imunocitoquímica

Após o tratamento, as células plaqueadas em lamínulas foram lavadas com PBS (Solução salina tamponada) e fixadas por 20 min. com 3,7% formaldeído (Merck, Darmstadt - Germany). Em seguida as células foram hidratadas com PBSA (Solução salina tamponada sem cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+})) e permeabilizadas com 0,1% Nonidet P-40 (USB, Cleveland – USA) por 20 min. As proteínas inespecíficas foram bloqueadas com um soro normalizador do mesmo animal do qual foi extraído o anticorpo secundário utilizado para esta reação e diluído em PBSA com 0,3% Triton (Merck – Darmstadt - Germany) por 1h em temperatura ambiente. Após este período, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo primário policlonal Anti-c-Jun; Anti-JunB; Anti-JunD; Anti-c-Fos; Anti-FosB; Anti-Fra1 e Anti-Fra2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA - USA), produzidos em coelhos, diluídos em uma solução de PBSA + 0,3% de Triton e 1 mg/ml de BSA (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis – USA), na

titulação de 1:800, e incubados em câmara úmida a 4 °C por no mínimo 12 h. Com exceção para os anticorpos Anti-Fra1 e Anti-Fra2, cuja titulação foi de 1:200.

Ao término do tempo, as lamínulas foram lavadas com PBSA e incubadas em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário biotinilado (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) anti-coelho, na titulação de 1:1000, diluído em PBSA + 0,3% Triton e 1,5% soro normalizador, seguidos de 3 lavagens com PBSA. Após este tempo as lamínulas foram incubadas com o complexo AB-avidina-biotina (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) por 1h, no qual o complexo AB se une ao anticorpo secundário, formando um complexo avidina/biotina/peroxidase. A revelação da proteína foi feita com extrato cromógeno de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis - USA) por 30 segundos, para sua oxidação pela peroxidase. Com isso é formado um precipitado de coloração marrom no local onde se encontra a proteína. Seguidas de lavagens em água Milli-Q, as células foram contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt - Germany), e diferenciadas com carbonato de lítio saturado (Merck, Darmstadt - Germany). As montagens das lamínulas em lâminas foram feitas com óleo mineral.

3.4 Análises dos resultados de Imunocitoquímica

A quantificação do número de núcleos marcados em cada lamínula foi realizada em microscopia de campo claro. Em cada uma das lamínulas foram contadas aproximadamente 500 células marcadas e não marcadas, contando, portanto 1000 células/tratamento em três experimentos independentes, isto é, em três preparações de culturas diferentes, em um total aproximado de 3000 células por tratamento. Foram considerados marcados os núcleos que apresentaram a coloração marrom do substrato DAB e os não marcados com coloração azul da hematoxilina. As análises estatísticas dos resultados de imunocitoquímica foram feitas através de um teste de variância ANOVA complementado com um pós-teste de Tukey-Kramer (Graph Pad InStat, 3.0).

3.5 Obtenção do Lisado Celular

Após o tratamento as células foram lisadas com um 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 1mM; PMSF 1mM; Aprotinina 2 µg/ml; Pepstatina 2 µg/ml; Leupeptina 2 µg/ml). As células lisadas foram então raspadas e homogeneizadas utilizando um raspador apropriado e movimentos circulares. Este lisado foi recolhido e clareado por centrifugação a – 4 °C por 15 min. a 14.000rpm, aliqüotado e estocado imediatamente em freezer a -80 °C. A quantificação da proteína total foi realizada com 10µl do lisado mais 990µl de Bradford (BioAgency, São Paulo - Brasil) (4:1 em água) e quantificadas em espectrofotômetro (Shimadzu – UV – VIS Spectrophotometer) em um comprimento de onda de 595 nm. Como padrão de calibração do aparelho e das amostras foi utilizada uma curva de albumina bovina (BSA) com concentrações conhecidas.

3.6 Experimentos de Western Blotting

As amostras quantificadas de proteínas foram adicionadas a uma solução tampão (tampão de amostra) e desnaturadas a 100°C por 5 minutos antes de serem aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante (PAGE-SDS). As proteínas retidas no gel e separadas conforme o peso molecular foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham-Pharmacia, Piscataway, USA), utilizando um sistema de Transferência Semi-Dry (Bio-Rad), por 60 min a 20V. A membrana foi corada com a solução de Ponceau para avaliar a eficiência da transferência e, em seguida, lavada com água Milli-Q.

A membrana contendo as proteínas de interesse foi incubada por 2 h em TBST (solução tampão Tris e 1% de Tween20) + 5% de leite desnatado para o bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida a membrana foi incubada sob agitação em câmara fria (4°C) com o anticorpo primário policlonal, Anti-c-Jun (1:500); Anti-JunB (1:500); Anti-JunD (1:500); Anti-c-Fos (1:100); Anti-FosB (1:100); Anti-Fra1 (1:100); Anti-Fra2 (1:200) e Anti-Tubulina (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), produzidos em coelhos, diluídos em uma solução de TBST com 1 mg/ml de BSA. Por último, a

membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase-streptavidina (Amersham-Pharmacia Piscataway, USA) diluídos na titulação 1:1000 em TBST por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Para revelação foi usado o Kit ECL-Amersham como substrato que utiliza Luminol, que depois de degradado pela enzima do anticorpo secundário emite luz e impressiona uma chapa de Raios X (Kodak, São Paulo - Brasil).

3.7 Análise dos resultados de Western Blotting

Os resultados dos experimentos de Western Blotting foram quantificados em um densitômetro (Gel-Pro Imager e Analyzer 3.1) diretamente das chapas de raios X, e os resultados, apresentados em gráficos, representam a média de no mínimo 3 experimentos independentes, isto é, com preparações de culturas primárias diferentes por tratamento. Os gráficos estão apresentados em porcentagem, onde as células carenciadas foram consideradas 100%. As análises estatísticas foram feitas através de um teste de variância ANOVA complementado com um pós-teste de Tukey-Kramer (Graph Pad InStat, 3.0).

4 RESULTADOS

4.1 A análise da expressão da proteína c-Jun

4.1.1 A análise por reação imunocitoquímica

Resultados anteriores utilizando a linhagem tumoral de supra-renal de camundongo, a linhagem Y-1 e culturas primárias de supra-renal de rato mostraram que as proteínas dos genes de resposta primária apresentam um máximo de expressão após 2h de tratamento com ACTH e FGF2 e que as concentrações ótimas para a expressão da proteína c-Fos são, respectivamente, 10^{-9} M e 10-20ng/ml (LOTFI e ARMELIN, 2001; MATTOS e LOTFI, 2005). Portanto, para a análise por imunocitoquímica da expressão dos demais membros da família Fos e Jun foram mantidos o mesmo padrão de concentração e tempo de resposta.

A análise, por reação de imunoperoxidase, do número de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R), não tratadas (Figura 07), que expressam a proteína c-Jun é de respectivamente $60,9 \pm 2,1\%$ e $63,8 \pm 9,1\%$. Tratamentos com ACTH não alteram de maneira significativa o número de núcleos marcados, em relação ao controle. Entretanto, tratamentos com FGF2 apresentam um aumento de, respectivamente, $15,0 \pm 1,5\%$ ($p \leq 0,01$) e $12,2 \pm 6,7\%$ ($p \leq 0,05$) nas células G e F/R. Um aumento similar ocorre em células tratadas com a combinação de 10^{-9} M ACTH e 20ng/ml FGF2, respectivamente, $16,0 \pm 6,3\%$ e $16,3 \pm 9,6\%$ ($p < 0,01$). Portanto, somente o FGF2 tem a capacidade de alterar o número de células que expressam a proteína c-Jun, além disso, os tratamentos conjuntos mostram que o ACTH não antagoniza o efeito de FGF2 na expressão desta proteína.

Figura 07 - Expressão da proteína c-Jun por imunocitoquímica em culturas primárias de células de adrenais de ratos, tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C). As barras brancas representam as células **Glomerulosas** e as barras cinzas às células **Fasciculadas/Reticulares**. Resultado representativo de 3 experimentos independentes. *p < 0,05; **p < 0,01 tratado vs C; # p < 0,05 ACTH vs FGF2 e ACTH vs AF.

Figura 08- Fotomicrografia de campo claro, representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína c-Jun nos núcleos de células Fasciculadas/Reticulares não tratadas (A) e tratadas com 10^{-9} M ACTH por 2h (B). As células foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris e diferenciadas com carbonato de lítio saturado. São considerados positivos os núcleos marcados em marrom (seta larga), e negativos os corados em azul (seta fina). (400X)

4.1.2. A análise da proteína por Western Blotting

Resultados da expressão de c-Jun por “imunoblotting” mostram que não há diferença significativa quando tratamos, ambos os tipos celulares com ACTH 10^{-7} M e 10^{-9} M, em relação às células não tratadas. (Resultados não mostrados).

Quando analisamos a cinética de expressão dessa proteína em função do tempo de tratamento com ACTH 10^{-9} M observamos que, em células G e F/R, as diferenças apresentadas tanto em relação às células carenciadas quanto aos tempos de tratamentos não são significativos, corroborando o resultado anterior que utiliza a mesma concentração.

Figura 09 - Resultado representativo da expressão da proteína c-Jun por Western Blotting em culturas primárias de células **Glomerulosas (G)** e **Fasciculadas/Reticulares (F/R)** de adrenais de ratos, tratadas por 1, 2, 4 e 6 horas com ACTH 10^{-9} M ou não tratadas. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

Resultados comparativos da expressão da proteína c-Jun em células G e F/R tratadas com 10^{-9} M ACTH e 20ng/ml FGF2 são apresentados na Figura 10. Observamos que independente do tratamento e das células utilizadas a expressão da proteína c-Jun não apresenta alterações significantes. A análise comparativa entre os resultados dos experimentos de imunocitoquímica e imunoblotting mostra que, independente da abordagem utilizada, o ACTH não promove alteração da expressão da proteína c-Jun em ambos os tipos celulares. No entanto, somente os experimentos de imunocitoquímica detectam o pequeno aumento do número de células que expressam essa proteína, em células tratadas com FGF2. Esses resultados mostram que a análise da proteína total por Western Blotting não foi capaz de detectar esse aumento da

expressão de c-Jun, mesmo porque a quantidade dessa proteína total expressa é bastante alta nesses tipos celulares. A proteína Tubulina foi utilizada como controle interno nesse e nos demais experimentos de Western Blotting.

Figura 10 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína c-Jun por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjunto. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína c-Jun. As barras brancas representam a expressão da proteína c-Jun nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de mais de 3 experimentos independentes.

4.2 A análise da expressão da proteína JunB

4.2.1 A análise da proteína por Imunocitoquímica

A análise da contagem dos núcleos marcados em células não tratadas, que expressam a proteína JunB (Figura 11) é similar nos dois tipos celulares, $42,3 \pm 3,7\%$ nas células Glomerulosas e $46,4 \pm 5,2\%$ nas células Fasciculadas/Reticulares. Comparativamente, o número de células que expressam a proteína JunB é menor do que o número de células que expressam a proteína c-Jun em células não tratadas. Todos os tratamentos produzem um aumento do número de células que expressam a proteína JunB. Tratamentos com ACTH induzem aumento de $13,3 \pm 4,4\%$ ($p \leq 0,01$) e $23,4 \pm 3,3\%$ ($p \leq 0,01$), FGF2 de $32,7 \pm 1,7\%$ ($p \leq 0,01$) e $24,9 \pm 0,3\%$ ($p \leq 0,01$) e tratamentos conjuntos de $31,9 \pm 9,9\%$ e $36,6 \pm 4,2\%$ ($p \leq 0,01$), no número de células que expressam a proteína JunB, respectivamente nas células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares.

Figura 11- Expressão da proteína JunB por imunocitoquímica em culturas primárias de células de adrenais de ratos, tratadas por 2 horas com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C). As barras brancas representam as células **Glomerulosas** e as barras cinzas as células **Fasciculadas/Reticulares**. Resultado representativo de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ tratado vs não tratado (C); # $p < 0,05$ FGF2 vs AF ou ACTH vs AF.

Figura 12 - Fotomicrografia de campo claro, representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína JunB nos núcleos de células Fasciculadas/Reticulares não tratadas (A) e tratadas com 10^{-9} M ACTH por 2h (B). As células foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e diferenciadas com carbonato de lítio saturado. São considerados positivos os núcleos marcados em marrom, e negativos os corados em azul. (200X)

4.2.2 A análise da proteína por Western Blotting

Na Figura 13, mostramos a expressão da proteína JunB em células tratadas com diferentes concentrações de ACTH e observamos que todas as concentrações utilizadas aumentam de forma significativa a expressão de JunB nos dois tipos celulares estudados. No entanto, células F/R tratadas com concentrações crescentes de ACTH não apresentam uma expressão de JunB dose-dependente. Nessas células a maior expressão de JunB é obtida com concentrações de ACTH 10^{-7} e 10^{-9} M. Já as células G o aumento de JunB é dose-dependente. As duas bandas reconhecidas pelo anticorpo anti-JunB (Santa Cruz) são referentes às duas formas de fosforilação de uma mesma proteína.

Figura 13 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína JunB por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína JunB. As barras brancas representam a expressão da proteína JunB nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de mais de 3 experimentos independentes. *p < 0,05; ***p<0,001: tratado vs Controle; # p < 0,05: ACTH⁷ vs ACTH⁹; ACTH¹⁰ vs ACTH⁷.

A análise da expressão da proteína JunB em células estimuladas por 2h com 10^{-9} M ACTH (Figura 14) mostra que a indução da proteína JunB nas células tratadas com ACTH é de 70% e 66% nas células G e nas células F/R, respectivamente. In contraste com a forte indução de JunB pelo ACTH, tratamentos com FGF2 promovem um aumento significativo (p > 0,05) de 40% da proteína JunB somente nas células F/R. Além disso, nessas células tratamentos conjuntos de ACTH e FGF2 promovem um

efeito somatório, que sugere que diferentes vias podem estar sendo utilizadas para ativação dessa proteína.

Figura 14 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína JunB por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína JunB. As barras brancas representam a expressão da proteína JunB nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de mais de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$: tratado vs Controle; ## $p < 0,01$; FGF2 vs ACTH; ### $p < 0,001$: FGF2 vs AF; ACTH vs AF.

Diferentemente do que foi observado por imunocitoquímica, a proteína JunB é pouco detectada por Western Blotting em células carenciadas para soro. Mas a maior diferença entre os dois métodos pode ser observada em células tratadas com ACTH. Embora ambos os métodos detectem aumento ou do número de células ou da proteína total, o aumento no número de células marcadas é aproximadamente 20% em ambos

os tipos celulares enquanto a quantidade total da proteína JunB detectada por imunoblotting é de 70%. Esses resultados sugerem um aumento da quantidade de proteína por célula. Por outro lado, tratamentos com FGF2 apresentam resultados contraditórios nas células G, pois apesar do aumento do número de células marcadas a quantidade de proteína total não se altera em relação ao controle; enquanto que para as células F/R o aumento observado é detectado por ambos os métodos utilizados.

4.3 A análise da expressão da proteína JunD

4.3.1 A análise da proteína por Imunocitoquímica

Como apresentado na Figura 15, $64,5 \pm 10,9\%$ das células G e $72,7 \pm 16,1\%$ das células F/R expressam JunD em células não tratadas e carenciadas para soro. Dentre as proteínas da família Jun que foram analisadas o número de células que expressam JunD é maior do que as que expressam JunB mas muito semelhante ao número de células carenciadas que expressam, c-Jun. Após tratamentos com ACTH e FGF2 observamos um aumento de número de núcleos marcados nas células G, em relação ao controle, de $18,5 \pm 0,7\%$ ($p \leq 0,01$) e $23,6 \pm 7,4\%$ ($p \leq 0,01$), respectivamente. No entanto, tratamentos combinados (AF), apresentam uma diminuição de $11 \pm 9\%$ ($p \leq 0,01$) do número de núcleos marcados nessas células, o que sugere uma interferência negativa nas vias de expressão dessa proteína. As células F/R não apresentam um aumento significativo do número células que expressam JunD, independente do tratamento utilizado.

Figura 15- Expressão da proteína JunD por imunocitoquímica em cultura primária de células de adrenais de ratos, tratadas por 2 horas com ACTH 10⁻⁹ M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C). As barras brancas representam as células **Glomerulosas** e as barras cinzas às células **Fasciculadas/Reticulares**. Resultado representativo de 3 experimentos independentes. *p<0,05: tratado vs não tratado (C); ## p<0,01: ACTH vs AF ou FGF2 vs AF.

Figura 16 - Fotomicrografia de campo claro, representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína JunD nos núcleos de células Glomerulosa, não tratadas (A) e tratadas com 10⁻⁹ M ACTH por 2h (B). As células foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e diferenciadas com carbonato de lítio saturado. São considerados positivos os núcleos marcados em marrom, e negativos os corados em azul. (400X)

4.3.2 A análise da proteína por Western Blotting

A análise da expressão da proteína JunD (Figura 17) em células estimuladas por diferentes concentrações de ACTH, mostra que há um aumento significativo da expressão da proteína apenas quando utilizamos a concentração 10^{-7} M ACTH nas células G. Nas células F/R, o que observamos é uma diminuição da expressão de JunD de maneira dose-dependente. Além disso, assim como para a proteína JunB, o anticorpo anti-JunD (Santa Cruz) reconhece duas formas fosforiladas da mesma proteína.

Figura 17 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína JunD por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína JunD. As barras brancas representam a expressão da proteína JunD nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de mais de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$: tratado vs Controle; # $p < 0,05$: ACTH $^{-9}$ vs ACTH $^{-7}$. ## $p < 0,01$: ACTH $^{-12}$ vs ACTH $^{-9}$. #### $p < 0,001$: ACTH $^{-12}$ vs ACTH $^{-9}$ vs ACTH $^{-7}$; ACTH $^{-10}$ vs ACTH $^{-9}$ vs ACTH $^{-7}$.

A análise da expressão da proteína JunD (Figura 18) foi fortemente detectada nas células G e F/R, carenciadas para soro. Ao induzirmos essas células com 10^{-9} M ACTH e com FGF2, ambos os tipos celulares não apresentam modificações significantes.

Figura 18 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína JunD por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína JunD. As barras brancas representam a expressão da proteína JunD nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de mais de 3 experimentos independentes.

No sentido de fazer um resumo do que foi anteriormente descrito, apresentamos na Tabela 01 os principais resultados da expressão das proteínas da família Jun. As células G e F/R carenciadas para soro, isto é, células não tratadas, expressam as proteínas da família Jun, sendo as proteínas c-Jun e JunD as mais expressas em ambos os métodos utilizados. Tratamentos com ACTH induzem de forma consistente um aumento da proteína JunB, em ambos os tipos celulares. No entanto, ao analisar o número de núcleos marcados, a proteína JunD também é induzida nas células G, quando tratadas com ACTH, mas em quantidade menor. Tratamentos com FGF2 aumentam o número de núcleos que expressam todas as proteínas da família Jun nas células Glomerulosas, o que difere de experimentos de Western Blotting, onde somente as proteínas c-Jun e JunD apresentam aumento. Já as células F/R tratadas com FGF2, em ambos os métodos analisados expressam as proteínas c-Jun e JunD de maneira significantes, independente do método utilizado.

Tabela 01: Proteínas da família Jun estão expressas nas culturas de células de supra-renal de rato após diferentes tratamentos.

	Imunocitoquímica		Western Blotting	
	G	F/R	G	F/R
Controle	c-Jun*/JunD	c-Jun/JunD	c-Jun/JunD	c-Jun/JunD
ACTH	JunB/JunD	JunB	JunB	JunB
FGF2	c-Jun/JunB/JunD	c-Jun/JunB	c-Jun/JunD	c-Jun/JunD

G: células Glomerulosas; F/R: células Fasciculadas/Reticulares; ACTH: Hormônio Adrenocorticotropico, FGF2: Fator de crescimento de fibroblasto 2. * em negrito as proteínas que são mais expressas em número de células marcadas ou por quantidade de proteína total.

4.4 A análise da expressão da proteína c-Fos

4.4.1 A análise da proteína por Imunocitoquímica

A análise da reação de imunocitoquímica por peroxidase para a identificação das células das adrenais de rato que expressam a proteína c-Fos (Figura 19), corrobora resultados anteriores do laboratório (MATTOS e LOTFI, 2005). Esses e os resultados apresentados aqui mostram que, culturas de células da supra-renal, carenciadas para soro por 24h, não apresentam expressão basal dessa proteína. No entanto, quando estimuladas com ACTH ou, FGF2 ou ainda com tratamentos conjuntos, observamos um aumento no número de células que expressam essa proteína. Portanto, tratamentos com ACTH mostram um aumento de $33,0 \pm 8,1\%$ ($p \leq 0,01$) e $41,2 \pm 0,7\%$ ($p \leq 0,001$) no número de núcleos marcados que expressam a proteína c-Fos, respectivamente para as células G e F/R, em relação ao controle. Tratamentos com FGF2 aumentam o número de núcleos marcados nas células G em $15 \pm 0,3\%$ ($p \leq 0,05$), e nas células F/R $35,7 \pm 0,5\%$ ($p \leq 0,001$) similar ao induzido pelo ACTH. Tratamentos conjuntos de ACTH e FGF2, mostram que a ação do ACTH se manteve sem a interferência do FGF2.

Figura 19- Expressão da proteína c-Fos por imunocitoquímica em cultura primária de células de adrenais de ratos, tratadas por 2 horas com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C). As barras brancas representam as células **Glomerulosas** e as barras cinzas às células **Fasciculadas/Reticulares**. Resultado representativo de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: tratado vs não tratado (C); # $p < 0,05$: ACTH vs FGF2 ou FGF2 vs AF; ## $p < 0,01$: ACTH vs FGF2 ou FGF2 vs AF.

Figura 20 - Fotomicrografia de campo claro, representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína c-Fos nos núcleos de células Fasciculadas/Reticulares, não tratadas (A) e tratadas com 10^{-9} M ACTH por 2h (B). As células foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e diferenciadas com carbonato de lítio saturado. São considerados positivos os núcleos marcados em marrom, e negativos os corados em azul. (200X)

4.4.2 A análise da proteína por Western Blotting

Na análise da expressão da proteína c-Fos, em células tratadas com diferentes concentrações de ACTH, observa-se aumento da expressão da proteína em relação ao controle, independente das concentrações utilizadas e com uma maior expressão com 2 horas de estímulo, para ambos os tipos celulares. (Resultados não mostrados).

A proteína c-Fos é fracamente detectada em células G e F/R carenciadas para soro, o que está de acordo com o observado na reação de imunocitoquímica. Quando tratamos as células G com 10^{-9} M ACTH, há um aumento significativo de 33% ($p < 0,001$) da proteína c-Fos, enquanto nessas células, FGF2 não estimula de maneira significativa essa proteína. Nas células F/R ambos os tratamentos estimulam de maneira significativa ($p < 0,001$) a expressão de c-Fos, 70% nas células tratadas com ACTH e 21% em células tratadas com FGF2. Além disso, nessas células tratamentos conjuntos aumentam em 80% a expressão dessa proteína em relação ao controle. Quando comparamos a expressão de c-Fos nos tratamentos conjuntos com os tratamentos com ACTH ou FGF2, o aumento é significativo e de respectivamente, 20% e 50%.

Figura 21 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína c-Fos por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína c-Fos. As barras brancas representam a expressão da proteína c-Fos nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de mais de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$: tratado vs Controle; ### $p < 0,001$; FGF2 vs ACTH ou FGF2 vs AF.

4.5 A análise da expressão da proteína FosB

4.5.1 A análise da proteína por Imunocitoquímica

Os resultados da expressão de FosB (Figura 22) nas células das supra-renais de rato não tratadas, mostram que essa proteína não é detectada nessas condições. Após tratamentos com ACTH, FGF2 ou ainda tratamentos conjuntos há aumento no número de células que expressam essa proteína. Após 2h de tratamento com ACTH, células G e F/R expressam, respectivamente, aumento do número de núcleos marcados de $83,6 \pm 3,4 \%$ ($p \leq 0,001$) e $66,8 \pm 2,0\%$ ($p \leq 0,001$), em relação as células não tratadas, enquanto tratamentos com FGF2, induzem um aumento de $39,1 \pm 3,3\%$ ($p \leq 0,001$) e $28,5 \pm 2,9\%$ ($p \leq 0,001$). Após tratamentos conjuntos há um aumento em relação ao controle de $77,8 \pm 1,0\%$ ($p \leq 0,001$) para as células Glomerulosas e de $61,7 \pm 3,0\%$ ($p \leq 0,001$) para as Fasciculadas/Reticulares, similar portanto à indução do ACTH sozinho. Em resumo, apenas a ação do ACTH se manteve, e assim como para a proteína c-Fos, não houve interferência da ação do FGF2 sobre a resposta do ACTH.

Figura 22- Expressão da proteína FosB por imunocitoquímica em cultura primária de células de adrenais de ratos, tratadas por 2 horas com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C). As barras brancas representam as células **Glomerulosas** e as barras cinzas às células **Fasciculadas/Reticulares**. Resultado representativo de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$: tratado vs não tratado (C); ### $p < 0,001$: FGF2 vs AF ou FGF vs ACTH.

Figura 23- Fotomicrografia de campo claro, representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína FosB nos núcleos de células **Glomerulosas** tratadas com ACTH 10^{-9} M por 2h. As células foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e diferenciadas com carbonato de lítio saturado. São considerados positivos os núcleos marcados em marrom, e negativos os corados em azul. (200X)

4.5.2 A análise da proteína por Western Blotting

A análise da expressão da proteína FosB, em células de adrenais de ratos, tratadas com diferentes concentrações de ACTH e diferentes tempos de tratamentos, mostra que não há alteração de expressão dessa proteína em ambos os tipos celulares estudados.

Como apresentado na figura 24, células não tratadas apresentam uma alta expressão da proteína FosB, em contraste com o observado pelo método de imunocitoquímica que não conseguiu detectar a expressão dessa proteína. Tanto tratamentos com ACTH quanto FGF2 não modulam de maneira significativa a expressão de FosB nas células F/R. A mesma resposta é observada nas células G tratadas com ACTH, no entanto nessas células, tratamentos com FGF2, promovem uma inibição de 19% da proteína.

Figura 24 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína FosB por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína FosB. As barras brancas representam a expressão da proteína FosB nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$: tratado vs Controle; # $p < 0,05$: ACTH vs FGF2.

4.6 A análise da expressão da proteína Fra1

4.6.1 A análise da proteína por Imunocitoquímica

Células Glomerulosas apresentam expressão basal de Fra1 de $6,8 \pm 1,6\%$ de núcleos marcados (Figura 25), enquanto que as células Fasciculadas/Reticulares apresentam expressão basal de $28,1 \pm 7,5\%$. Quando tratamos essas células com ACTH por 2h observamos aumento do número de núcleos marcados, em relação ao controle não tratado, de $9,5 \pm 1,7\%$ ($p < 0,001$) e de $17,6 \pm 2,9\%$ ($p < 0,01$), para respectivamente, células G e F/R. Células Glomerulosas tratadas com FGF2 apresentam um aumento similar ao tratamento de ACTH ($18,5 \pm 1,3\%$ ($p < 0,001$)). No entanto, as células F/R, quando induzidas com FGF2, apresentam uma diminuição em relação ao tratamento com ACTH de $14,0 \pm 3,2\%$ ($p < 0,05$). Ao analisarmos tratamentos conjuntos de ACTH e FGF2, observamos que as células G apresentam aumento em relação ao controle de $10,7 \pm 2,0\%$ ($p < 0,001$), já as células F/R, apresentam uma diminuição de $15,9 \pm 0,76\%$ ($p < 0,01$). Em resumo, independente do tratamento utilizado, as células G apresentam aumento do número de células que expressam a proteína Fra1, já as células F/R, os tratamentos conjuntos mostram que o FGF2 interfere na ação do ACTH na expressão desta proteína.

Figura 25- Expressão da proteína Fra1 por imunocitoquímica em culturas primárias de células de adrenais de ratos, tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C). As barras brancas representam as células **Glomerulosas** e as barras cinzas às células **Fasciculadas/ Reticulares**. Resultado representativo de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$: tratado vs não tratado (C); # $p < 0,05$: ACTH vs FGF2; ## $p < 0,01$: FGF2 vs AF; ### $p < 0,001$: ACTH vs AF.

Figura 26- Fotomicrografia de campo claro, representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína Fra1 nos núcleos de células **Fasciculadas/Reticulares** tratadas com ACTH 10^{-9} M por 2h. As células foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e diferenciadas com carbonato de lítio saturado. São considerados positivos os núcleos marcados em marrom, e negativos os corados em azul. (200X).

4.6.2 A análise da proteína por Western Blotting

Quando diferentes concentrações de ACTH foram utilizadas (Figura 27), observamos que, em ambos os tipos celulares, houve um aumento da expressão da proteína Fra1, em comparação com as células carenciadas que apresentam uma expressão pouco detectável. Nas células G, a proteína sofreu uma maior indução com a concentração 10^{-7} M ACTH enquanto que para as células F/R a concentração ótima para a indução da proteína foi a concentração 10^{-9} M ACTH.

Figura 27 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína Fra1 por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína Fra1. As barras brancas representam a expressão da proteína Fra1 nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: tratado vs Controle; # $p < 0,05$: ACTH $^{-12}$ vs ACTH $^{-7}$ ou ACTH $^{-12}$ vs ACTH $^{-9}$; ## $p < 0,01$: ACTH $^{-9}$ vs ACTH $^{-7}$ ou ACTH $^{-10}$ vs ACTH $^{-9}$; ### $p < 0,001$: ACTH $^{-12}$ vs ACTH $^{-7}$.

Resultados da expressão da proteína Fra1, induzida por 2h com ACTH e com FGF2 (Figura 28), mostram que nas células Glomerulosas ACTH e FGF2 induzem aumento da proteína Fra1 de 20% e 32%, respectivamente ($p < 0,001$). Por outro lado, nas células F/R, não há diferença significativa entre células tratadas e não tratadas. Tratamentos conjuntos de ACTH e FGF2 bloqueiam a expressão dessa proteína, diminuindo sua expressão em 17% ($p < 0,001$), o que sugere uma interferência negativa da ação de um tratamento sobre o outro.

Figura 28 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína Fra1 por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (Controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína Fra1. As barras brancas representam a expressão da proteína Fra1 nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$: tratado vs Controle; ### $p < 0,001$: ACTH vs AF ou FGF2 vs AF; ## $p < 0,01$: ACTH vs FGF2.

4.7 A análise da expressão da proteína Fra2

4.7.1 A análise da proteína por Imunocitoquímica

A análise da expressão basal da proteína Fra2 (Figura 29) nas células da supra-renal de rato por reação de imunoperoxidase mostra uma expressão baixa e similar entre as células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares de, respectivamente, $14,1 \pm 0,5\%$ e $18,0 \pm 0,8\%$. Quando tratamos essas células com ACTH e com FGF2 por 2h, é observado um aumento do número de núcleos marcados, em relação ao controle. Tratamentos com ACTH apresentam um aumento de, respectivamente, $39,5 \pm 5,8\%$ ($p < 0,001$) e $62,3 \pm 7,2\%$ ($p < 0,001$) nas células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares. Células Glomerulosas tratadas com FGF2 apresentam um aumento do número de núcleos marcados de $44,0 \pm 4,3\%$ ($p < 0,001$) e similar ao número de células induzidas pelo ACTH. No entanto, as células Fasciculadas/Reticulares apresentam uma indução menor de $36,6 \pm 3,6\%$ ($p < 0,001$) em relação a Glomerulosa e em relação à indução pelo ACTH nas mesmas células.

Células tratadas com a combinação de ACTH e FGF2 apresentam expressão semelhante de, respectivamente, $40,9 \pm 6,6\%$ e $43,6 \pm 1,9\%$ ($p < 0,01$) para células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares. Portanto, nas células F/R a ação do FGF2 interfere negativamente na resposta ao ACTH diminuindo a indução da expressão da proteína Fra2.

Figura 29- Expressão da proteína Fra2 por imunocitoquímica em culturas primárias de células **Glomerulosas** (G) e **Fasciculadas/Reticulares** (F/R) de adrenais de ratos, tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos (AF) ou não tratadas (C). Resultado representativo de 3 experimentos. *** $p < 0,001$: tratado vs não tratado (C); ### $p < 0,001$: ACTH vs FGF2; ## $p < 0,01$: ACTH vs AF.

Figura 30- Fotomicrografia de campo claro, representativa de reação de imunoperoxidase da expressão da proteína Fra2 nos núcleos de células **Fasciculadas/Reticulares** tratadas com ACTH 10^{-9} M por 2h. As células foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e diferenciadas com carbonato de lítio saturado. São considerados positivos os núcleos marcados em marrom, e negativos os corados em azul. (200X).

4.7.2 A análise da proteína por Western Blotting

Quando analisamos a resposta da expressão de Fra2 em células tratadas com diferentes concentrações de ACTH (Figura 31) observamos um aumento similar com tratamentos com 10^{-9} M e 10^{-7} M ACTH. No entanto, nas células Fasciculadas/Reticulares, concentrações mais altas induzem a expressão da proteína.

Figura 31 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína Fra2 por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-12} M. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína Fra2. As barras brancas representam a expressão da proteína Fra2 nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: tratado vs Controle; ## $p < 0,01$: ACTH $^{-12}$ vs ACTH $^{-7}$ ou ACTH $^{-12}$ vs ACTH $^{-9}$ ou ACTH $^{-12}$ vs ACTH $^{-10}$.

Na Figura 32 observamos que ambos os tipos celulares tratados com ACTH apresentam um aumento da expressão da proteína Fra2. Já, ao tratarmos essas células com FGF2, apenas as células Glomerulosas apresentam um aumento da expressão da proteína. Tratamentos conjuntos (AF) analisados nas células Fasciculadas/Reticulares mostram uma diminuição da expressão desta proteína em relação a tratamentos isolados.

Figura 32 – (A) Resultado representativo da expressão da proteína Fra2 por Western Blotting em culturas primárias de células Glomerulosas (G) e Fasciculadas/Reticulares (F/R) de adrenais de ratos, não tratadas (controle) ou tratadas por 2h com ACTH 10^{-9} M, FGF2 20ng/ml e tratamentos conjuntos. (B) Análise densitométrica da detecção da expressão da proteína Fra2. As barras brancas representam a expressão da proteína Fra2 nas células G e as barras cinza nas F/R. Os resultados da quantificação são a média de mais de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$: tratado vs Controle; # $p < 0,05$: ACTH vs FGF2 ou FGF2 vs AF; ## $p < 0,01$: ACTH vs AF.

Em resumo (Tabela 02), as células G e F/R carenciadas para soro apresentam, dependendo do método utilizado, uma maior expressão das proteínas Fra2 e FosB. Quando as células são estimuladas com ACTH esse padrão de expressão se modifica principalmente com o aumento da expressão de c-Fos e FosB, enquanto que a expressão de Fra2 se mantém alta. O aumento da expressão de FosB foi principalmente detectado por imunocitoquímica. Os tratamentos das células com FGF2 apresenta uma maior diversificação de expressão das proteínas da família Fos. No entanto, diferenças importantes foram observadas em relação aos métodos utilizados.

Tabela 02: Proteínas da família Fos estão expressas nas culturas de células de supra-renal de rato após diferentes tratamentos.

	Imunocitoquímica		Western Blotting	
	G	F/R	G	F/R
Controle	Fra2*	Fra1	FosB/Fra2	FosB/Fra1/ Fra2
ACTH	c-Fos/FosB/Fra2	c-Fos/FosB/Fra2	c-Fos/Fra1/Fra2	c-Fos/Fra2
FGF2	Fra2	c-Fos/FosB/Fra2	Fra1/Fra2	c-Fos/FosB

G: células Glomerulosas; F/R: células Fasciculadas/ Reticulares; ACTH: Hormônio Adrenocorticotropico e FGF2: fator de crescimento de fibroblasto 2. * em negrito as proteínas que são mais expressas em número de células marcadas ou por quantidade de proteína total.

5 DISCUSSÃO

As células tumorais de supra-renal de camundongos, a linhagem Y1, carenciadas para soro, portanto mantidas antes do “checkpoint” da fase G1 do ciclo celular, e estimuladas com pulsos de ACTH de no máximo de 2h, são induzidas a progredir no ciclo celular da fase G1 para a fase S (LOTFI *et al.*, 1997). Essa transição inclui a fosforilação da via de sinalização MAPK-ERK1-2 e a expressão das proteínas c-Fos e c-Jun (LOTFI e ARMELIN, 2001). No entanto, tratamentos prolongados com ACTH bloqueiam a proliferação e a transição da fase G1 para a fase S, e antagoniza a atividade mitogênica apresentada pelo FGF2 nessas células, bloqueando a entrada em S. No entanto, uma das características da linhagem Y1 é uma amplificação do proto-oncogene c-Ki-ras (SCHWAB *et al.*, 1983) que parece ser necessária para a manutenção do fenótipo tumoral dessas células (KIMURA e ARMELIN, 1988). Em vista disso, em um trabalho anterior, investigamos em culturas primárias de supra-renal de rato a ação biológica do ACTH e do FGF2, a sinalização iniciada nos seus diferentes receptores, bem como a capacidade de indução da expressão da proteína c-Fos, um marcador de proliferação celular (MATTOS e LOTFI, 2005). Nossos resultados mostraram que pulsos de ACTH não estimulam a entrada em fase S do ciclo celular das células adrenais em culturas primárias, em contraste com o que havia sido previamente observado na linhagem Y1. Além disso, nós observamos que FGF2 estimula fortemente, mas de maneira transiente, a via MAPK-ERK1-2 bem como uma fraca indução da proteína c-Fos, tanto nas células da Glomerulosa (G) quanto nas células Fasciculada/Reticulares (F/R). Por outro lado, ACTH não estimula a fosforilação de ERK1-2, mas induz fortemente a expressão da proteína c-Fos. Portanto, em conjunto, esses resultados mostraram que o bloqueio do efeito mitogênico exercido pelo ACTH ocorre independente da indução da proteína c-Fos.

Em trabalho mais recente investigamos o efeito biológico do ACTH e do FGF2 nas culturas primárias de adrenal de rato em tratamentos prolongados e sustentados de até três dias (MATTOS *et al.*, 2007). Analisamos o índice proliferativo através da contagem do número de células por 24h, 48h e 72h, a viabilidade celular por ensaio de MTS, e a morte celular através da análise de marcação por Anexina V. Observamos que tratamentos sustentados com o ACTH diminuíram o índice proliferativo e a

viabilidade através da indução de apoptose, mas não necrose, das células G e F/R, enquanto o FGF2 apresentou efeitos opostos aumentando o índice proliferativo e se comportando, portanto, como um mitogênico em células adrenais.

Trabalhos do laboratório que utilizaram modelos *in vivo*, ratos hipofisectomizados ou tratados com dexametasona (DEX), (TORRES e LOTFI, 2007; BACCARO *et al.*, 2007) para a análise do número de células que entraram em fase S do ciclo celular, mostraram que em animais hipofisectomizados a atrofia do córtex observada principalmente na zona Fasciculada (ZF) está relacionada com a indução da proteína JunB, sugerindo a formação de um complexo AP-1 inibitório. O acúmulo de c-Jun/JunD e c-Fos/FosB, mas não JunB, na ZF e na zona reticulada (ZR) sugere que, após o tratamento desses animais com ACTH, são esses os principais componentes de AP-1 nessas zonas. Nessas zonas do córtex adrenal, o ACTH estimula o aumento do número de células na fase S do ciclo celular, indicando que a composição do complexo AP-1 está relacionada com a proliferação. De uma maneira geral, nossos resultados nesses modelos experimentais implicam a família desses fatores de transcrição, particularmente a dinâmica de expressão das proteínas da família Jun, na regulação do controle do ciclo celular durante a indução de proliferação observada pelo ACTH no córtex da supra-renal de ratos.

Os resultados acima descritos e a importância da composição do fator de transcrição AP-1 nos efeitos biológicos, nos instigaram a investigar a indução da expressão das proteínas da família Fos e Jun nas culturas primárias de células adrenais tratadas com ACTH e FGF2.

Os resultados do presente trabalho mostram que os efeitos do ACTH e do FGF2 foram capazes de modificar o padrão de expressão das proteínas do complexo AP-1. Com a alteração desse padrão podemos inferir que a composição do complexo AP-1 também pode se modificar, portanto modular a decisão das células adrenais de proliferarem, diferenciarem ou morrerem (HESS *et al.*, 2004).

Os complexos que formam AP-1 são fatores de transcrição que são induzidos na maioria das células por vários estímulos, mas que em estados basais, isto é, sem o estímulo de fatores de crescimento, não são detectados na maioria dos tecidos (MORGAN e CURRAN, 1991). A glândula supra-renal não é padrão neste sentido, pois

ela expressa diferentes membros das famílias de genes de resposta primária *in vivo* e *in vitro* (TORRES E LOTFI, 2007, PENNYPACKER *et al.*, 1992, IMAI *et al.*, 1990). O mesmo foi observado nas culturas primárias de células adrenais de ratos carenciadas para soro, de maneira que sob esse aspecto a análise *in vitro* está de acordo com o observado *in vivo*.

Nas condições basais, isto é, quando as células estão carenciadas para soro e sem os fatores de crescimento, nossos resultados mostram que nessas condições as proteínas que estão expressas são as proteínas c-Jun e JunD, e dependendo do método utilizado, observamos uma maior expressão das proteínas Fra2 e FosB. Diferentes resultados foram obtidos da expressão das proteínas JunB e FosB dependendo do método utilizado, reforçando portanto a importância da utilização do método de imunocitoquímica (IC) e imunoblotting (WB) nesse trabalho. De fato, a baixa expressão de uma proteína por célula pode não ser detectada pelo anticorpo (IC), mas pode ser detectada como fortemente expressa na análise da proteína total (WB). Esses dados estão de acordo com os resultados da análise da composição de AP-1 em células de supra-renal que apontam c-Jun e JunD como os maiores componentes de AP-1 em estado basal (SMITH, BURKE e CARTER, 1996) e a não expressão da proteína c-Fos na linhagem Y1, nestas condições (LOTFI *et al.*, 1997). Além disso, esses resultados da não expressão de c-Fos em culturas primárias de adrenal de rato corroboram os resultados anteriores do laboratório como descrito em Mattos e Lotfi, 2005.

Após o tratamento com ACTH há uma mudança no padrão de expressão das proteínas analisadas, sugerindo que o ACTH pode ser o responsável por uma alteração da composição de AP-1 nas culturas primárias de adrenal de rato e conseqüentemente no efeito biológico. A mudança de padrão de expressão protéica mais evidente foi a expressão da proteína JunB, que foi induzida pelo ACTH nas formas fosforilada e não fosforilada, enquanto que as proteínas c-Jun e JunD não sofreram alterações no seu padrão de expressão. No entanto, quando foi analisada a expressão da proteína c-Jun fosforilada (resultados não mostrados; MATTOS *et al.*, 2007) o ACTH inibiu a fosforilação/ativação dessa proteína. A mudança do padrão de fosforilação de c-Jun favorece a formação de AP-1 contendo na sua composição a proteína JunB em

detrimento da proteína c-Jun e JunD, formando assim um complexo com características regulatórias negativas para a progressão do ciclo celular. De fato, em fibroblastos derivados de camundongos, a superexpressão da proteína JunB inibiu a proliferação mediada pela indução do inibidor de ciclo celular a proteína p16^{INK4a} (PASSEGUÉ e WAGNER, 2000), que por sua vez age através do controle da expressão da ciclina D1, que é ativada pela proteína c-Jun (BAKIRI *et al.*, 2000). Resultados anteriores descritos em Chiu, Angel e Karin (1989) indicam que c-Jun e JunB exibem atividades biológicas diferentes em vários tipos celulares. A proteína c-Jun é um ativador eficiente de promotores com seqüências contendo elementos responsivos a ésteres de forbol (TRE-TPA response element) enquanto JunB falha na ativação desses elementos e inibe sua ativação pela proteína c-Jun. Além disso, JunB compete e regula negativamente a proteína c-Jun, pois homodímeros formados por JunB formam fatores de transcrição fracos e podem reprimir a atividade de c-Jun (EFERL e WAGNER, 2003), relacionando, portanto, a proteína JunB com efeitos anti-proliferativos (JOCHUM *et al.*, 2001).

Com relação aos membros da família Fos a alteração mais evidente da mudança do padrão de expressão dessas proteínas, após estímulo com ACTH é a expressão da proteína c-Fos, que, apesar de nas condições basais não estar expressa, é rapidamente induzida. Este aumento da expressão de c-Fos foi observado anteriormente e descrito em trabalhos publicados que utilizam a linhagem Y1, em células da fasciculada de bovinos, células BAC, e em culturas primárias de supra-renal de rato (KIMURA *et al.*, 1993; VIARD *et al.*, 1994; LOTFI *et al.*, 1997; MATTOS e LOTFI, 2005). A proteína c-Fos é considerada um marcador mitogênico em culturas de células de fibroblastos NIH3T3 (KOVARY e BRAVO, 1991a), no entanto, apesar de fortemente induzida, o efeito biológico observado em algumas células tumorais e normais sugerem que c-Fos pode não ser o marcador mais importante da transição G1-S do ciclo celular. De fato, um trabalho com fibroblastos mostra que micro-injeções de anticorpos contra os três membros da família Jun previnem a síntese de DNA mais eficientemente do que qualquer anticorpo anti-Fos (KOVARY e BRAVO, 1991b). Além disso, apesar das observações não serem diretas, existe uma forte relação entre a expressão de c-Fos e o controle de genes relacionados com a função esteroidogênica das células adrenais. (LIU *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 1990)

As proteínas c-Fos, FosB e Fra-1 são rapidamente induzidas em resposta a fatores relacionados com proliferação celular, mas não são essenciais na progressão do ciclo, pois fibroblastos em culturas que não expressam essas proteínas continuam progredindo no ciclo celular (HU *et al.*, 1994). Entretanto, Brown e colaboradores (1998), utilizaram culturas de fibroblastos mutantes para as proteínas c-Fos e FosB e observaram que estas células proliferam mais devagar, devido principalmente a uma indução pouco efetiva da ciclina D1, que é um regulador positivo do ciclo celular, sugerindo que estas proteínas podem ser complementares.

O presente trabalho mostrou que outros membros da família Fos, FosB, Fra1 e Fra2, também são induzidos após a indução com ACTH, mas de forma menos intensa que a proteína c-Fos. O aumento da expressão da proteína FosB pode ser principalmente detectado pelo método de imunocitoquímica, já as proteínas Fra1 e Fra2, foram induzidas de forma significativa independente do método utilizado. A proteína FosB pode ligar-se aos produtos c-Jun e JunB e influenciar positivamente a ligação destas proteínas (ZERIAL *et al.*, 1989). Lehoux e Ducharme (1995) mostraram por hibridização *in situ*, que após 30min do estímulo com ACTH houve um aumento no mRNA de FosB. Foram também observados nas zonas Glomerulosa e Reticulada, pelo método de imunohistoquímica, o aumento da expressão das proteínas FosB e Fra1 em animais hipofisectomizados (*in vivo*) e somente de Fra1 em animais infundidos (*in situ*), o que relaciona a proteína Fra1 com entrada em S do ciclo celular. (TORRES e LOTFI, 2007; BACCARO *et al.*, 2007). Zajchowski e colaboradores (2001) utilizando culturas de células tumorais de mama, verificaram aumento da expressão da proteína Fra1 e relacionaram este aumento com a agressividade do tumor, sugerindo que esta proteína pode estar relacionada à proliferação desses tumores.

Portanto, após análise da expressão das diferentes proteínas da família Fos e Jun induzidas pelo ACTH podemos propor uma composição provável de AP-1. A não ativação/fosforilação de c-Jun, a indução consistente das proteínas JunB, c-Fos e FosB, sugere que AP-1 pode estar constituído por JunB/c-Fos ou FosB, que é compatível com um fator de transcrição que regula negativamente a progressão do ciclo celular. De forma especulativa, podemos dizer que essa composição do fator de transcrição AP-1, com características pouco favoráveis à proliferação após indução pelo ACTH, poderia

ser um dos elementos responsáveis pelo mecanismo de inibição da proliferação observada nas culturas primárias de supra-renal de rato.

Após o tratamento com FGF2, observamos um aumento da expressão das proteínas da família Jun e uma maior diversificação na expressão das proteínas da família Fos nas culturas primárias de rato, em relação às células não tratadas. Feige e colaboradores (1998) associaram a expressão e funções biológicas do FGF2, como um fator mitogênico em uma série de células e tecidos, incluindo o córtex da supra-renal. O FGF2 está descrito como um potente mitogênico que promove a progressão do ciclo celular em culturas de células de fibroblastos NIH3T3 (ARMELIN, 1973), em culturas primárias de adrenocórtex bovina (GOSPODAROWICS *et al.*, 1975) e em culturas primárias de supra-renal de rato (MATTOS e LOTFI, 2005).

Os resultados aqui descritos mostram que em culturas de células adrenais de rato, as três proteínas que compõem a família Jun estão aumentadas quando estimuladas com FGF2. Estes resultados corroboram os resultados de Baccaro e colaboradores (2007) que, utilizaram glândulas adrenais infundidas com FGF2, e observaram na zona mais interna do córtex adrenal indução de c-Jun, JunB e JunD, com um efeito mitogênico significativo na zona Reticulada. O efeito mitogênico induzido nas zonas mais internas do córtex também foi observado por Torres e Lotfi (2007), utilizando animais hipofisectomizados injetados com FGF2. Em experimentos que utilizaram culturas primárias de supra-renal, além da indução do aumento do número de células que expressam a proteína c-Jun detectada por Imunocitoquímica, observamos que essa proteína está na forma fosforilada/ativada, em contraste com que foi observado nas culturas tratadas com ACTH, onde a fosforilação/ativação está inibida (MATTOS *et al.*, submetido). Portanto, juntos esses resultados sugerem que a indução da proteína c-Jun pode ter um papel importante na proliferação induzida pelo FGF2, mesmo na presença de JunD e na indução fraca da proteína JunB. Interessantemente, a linhagem tumoral de adrenal de camundongo, a Y1, após tratamento prolongado com FGF2 apresenta, por um mecanismo ainda não explicado, indução da morte celular após as células terem entrado em fase S do ciclo celular (COSTA *et al.*, 2004).

Por outro lado, FGF2 também induz um aumento da expressão das proteínas c-Fos e FosB, mas de maneira menos intensa quando comparada ao ACTH, sugerindo

que essa proteína pode não ser determinante para entrada em S em células adrenais normais, como o observado em tratamentos com ACTH. No entanto, as células Glomerulosas também apresentam aumento da expressão da proteína Fra2, e apesar desta proteína estar relacionada com a agressividade tumoral, o que sugere envolvimento proliferativo dessa proteína, heterodímeros formados por JunD/Fra2 estão relacionados com inibição de proliferação em mielomas. (REZZONICO *et al.*, 1995). Já c-Jun/Fra2 induz a proliferação assim como c-Jun/c-Fos, mas podem estar envolvidos em numerosos processos celulares, como proliferação, diferenciação, transformação e apoptose (BAKIRI, 2002).

Portanto, as análises das expressões das diferentes proteínas das famílias Fos e Jun, induzidas pelo FGF2, sugerem um complexo AP1 composto pelas proteínas c-Jun, c-Fos, FosB e Fra2. Essa composição de AP1 pode estar relacionada com o mecanismo de proliferação induzido pelo FGF2 nas culturas primárias de supra-renal de ratos.

Uma das hipóteses que foi testada nesse trabalho se refere à possibilidade de um fator parácrino como FGF2 modular a ação do ACTH, um fator endócrino. Portanto, utilizamos tratamentos conjuntos de ACTH e FGF2 nas culturas primárias de células adrenais de ratos. Em conjunto os resultados obtidos e analisados por Western Blotting nas células F/R e por imunocitoquímica em ambos os tipos celulares tratados com ACTH e FGF2 não apresentam, de uma maneira geral, alterações da expressão das proteínas quando comparadas com os tratamentos com ACTH. As exceções foram um aumento significativo da expressão de JunB detectado nas células F/R e uma diminuição significativa das proteínas Fra-1 e Fra-2. Esses resultados sugerem um AP1 composto por JunB/c-Fos e FosB. De fato, em células G e F/R tratadas com ACTH e FGF2, não há aumento no número de células na fase S do ciclo celular quando comparadas com células não tratadas (MATTOS e LOTFI, 2005), reforçando a ação do ACTH como não mitogênico nas supra-renais, além do papel de JunB na composição de um complexo AP-1 com características não favoráveis à proliferação. No entanto, experimentos que analisaram a entrada em S de animais hipofisectomizados e injetados com a combinação de ACTH e FGF2, mostram que há uma interferência negativa do FGF2 na ação mitogênica do ACTH *in vivo*, pois nesses animais há uma

diminuição significativa de células em síntese de DNA juntamente com uma diminuição da expressão das proteínas Jun e Fos (TORRES e LOTFI, 2007).

Em conjunto esses resultados mostraram avanços no entendimento dos mecanismos pelos quais o ACTH não é mitogênico em culturas de células adrenais normais. Além disso, esses resultados abrem novas perspectivas a serem testadas da função dessas proteínas na inibição do efeito proliferativo do ACTH *in vitro*. Além da comprovação, por análise de EMSA e/ou ChIP assay, da composição do complexo AP-1 sugerido nesses estudos, abrem-se novas possibilidades de estudo como a utilização de RNA de interferência na expressão de JunB e de outras proteínas do complexo, na tentativa de reverter, pelo menos em parte, o efeito anti-proliferativo do ACTH nessas células.

6 CONCLUSÕES

O sistema de cultura primária de células de supra-renal de ratos está estabelecido e é um modelo experimental eficiente para o estudo da ação do ACTH e do FGF2.

Os resultados obtidos dependem do método utilizado, o que reforça a importância da utilização de métodos complementares para a detecção de proteínas.

O tratamento com ACTH das células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares é capaz de modificar o padrão de expressão das proteínas Fos e Jun para um complexo AP-1 relacionado com a regulação negativa da progressão do ciclo celular.

O tratamento com FGF2 das células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares é capaz de modificar o padrão de expressão das proteínas Fos e Jun para um complexo AP-1 relacionado com a indução de proliferação.

O tratamento com ACTH e FGF2 das células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares não apresenta alterações que possam sugerir um efeito “parácrino” do FGF2 sobre a ação “endócrina” do ACTH, de maneira que não é através do FGF2 exógeno que o ACTH é um mitogênico indireto.

As composições sugeridas do complexo AP-1 estão de acordo com os efeitos biológicos observados da ação do ACTH e do FGF2 nas culturas primárias de adrenal de rato, que são, respectivamente, de inibição e proliferação celular.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Front Neuroendocrinol**, v.15, n.4, p.321-350, 1994.
- ANGEL, P.; KARIN, M. The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **Bioch. Bioph. Acta**, n.1072, p.129-157, 1991.
- ARMELIN, H.A. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, n. 9, p. 2702-2706, 1973.
- ARMELIN, H.; LOTFI, C.F.; LEPIQUE, A.P. Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of mouse adrenocortical cells. **Endocrine Res**, n.22, p. 373-383, 1996.
- BACCARO, R.B.; MENDONÇA, P.O.; TORRES, T.E.; LOTFI, C.F. Immunohistochemical Jun/Fos protein localization and DNA synthesis in rat adrenal cortex after treatment with ACTH or FGF2. **Cell Tissue Res**, v.328, n.1, p.7-18, 2007.
- BAKIRI, L.; MATSUO, K.; WISNIEWSKA, M.; WAGNER, E.F.; YANIV, M. Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. **Mol Cell Biol**, v.22, n.13, p.4952-4964, 2002.
- BAKIRI, L.; LALLEMAND, D.; BOSSY-WETZEL, E.; YANIV, M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. **EMBO J**, v.19, n.9, p. 2056-2068, 2000.
- BLAGOSKLONNY M.V; PARDEE, A.B. The restriction point of the cell cycle. **Cell Cycle**, v.1, n.2, p.103-110, 2002.
- BOTTCHER, R. T.; NIEHRS, C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. **Endocrinol. Rev.**, v.26, n.1, p.63-77, 2005.
- BRAVO R. Growth factors inducible genes in fibroblasts. **EMBO J**, p. 324-343, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, J.R.; NIGH, E.; LEE, R.J.; YE, H.; THOMPSON, M.A.; SAUDOU, F.; PESTELL, R.G.; GREENBERG, M.E. Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. **Mol Cell Biol**. V.18, p. 5609-5619, 1998.
- CARSIA, R. V.; MACDONALD, G. J.; GIBNEY, J. A.; TILLY, K. I.; TILLY, J. L. Apoptotic cell death in the rat adrenal gland: an in vivo and in vitro investigation. **Cell Tissue Res**, v.283, p. 247-254, 1996.
- CAVALIERI, F.; RUSCIO, T.; TINOCO, R.; BENEDICTS, S.; DAVIS, C.; VOGOT, P.K. Isolation of three new avian sarcoma viruses: ASV 9, ASV 17, and ASV 25. **Virology**, v.143, n.2, p. 680-68, 1985.
- CHINENOV, Y.; KERPPOLA, T.K. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. **Oncogene**, v.20, p. 2438-2452, 2001.
- CHIU, R.; ANGEL, P.; KARIN, M. Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. **Cell**, v. 59, n.6, p.979-986, 1989.

COHEN, D.R.; CURRAN, T. Fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. **Mol. Cell Biol**, v.8, n.5, p. 2063-2069, 1988.

COSTA, E.T.; FORTI, F.L.; ROCHA, K.M.; MORAES, M.S.; ARMELIN, H.A. Molecular mechanisms of cell cycle control in the mouse Y1 adrenal cell line. **Endocrinol. Res**, v. 30, n.4, p.503-509, 2004.

CURRAN, T.; MACCONNELL, W.P.; STRAATEN, F.; VERMA, I.M. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos from mouse and human cells. **Mol. Cell Biol**, v. 3, p. 914-921, 1983.

CURRAN T. The fos oncogene. **The Oncogene Handbook**, edited by E.P. Reddy, A.M. Skelke T. Curran. 1988.

DAVIS, K. T.; MCDUFFIE, I.; MAWHINNEY, L. A.; MURRAY S.A. Hypophysectomy results in a loss of connexin gap junction protein from the adrenal cortex. **Endocrinol. Res**, v.26, p.561–570, 2000.

DUBRAVKA, D.; SCOTT, D. W. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. **Cell Res**, v.10, p.1-16, 2000.

EFERL, R.; WAGNER, E.F. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. **Nat Rev**, v.3, p. 859-868, 2003.

FEIGE, J. J.; VILGRAIN, I.; BRAND, C.; BAILLY, S.; SOUCHELNITSKIY, S. Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors. **J Endocrinol**. v.158, p.7-19, 1998.

FINKEL, M.P.; BISKIS, B.O.; JINKIS, P.B. Virus induction of osteosarcomas in mice. **Science**, v.151, n.711, p. 698-701, 1966

FOLETTA, V.C. Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2. **Immunol Cell Biol**, v.74, n.2, p.121-133, 1996.

GAMBARINI, A.G.; ARMELIN, H.A. Purification and partial characterization of an acidic fibroblast growth factor from bovine pituitary. **J Biol Chem**, v.25, p. 9692-9697, 1982.

GOSPODAROWICZ, D. Purification of FGF from bovine pituitary. **J. Biol Chem**, v.250, n. 7, p. 2515-2520, 1975.

HERSCHMAN, H. R. Primary Response Genes Induced by Growth Factors and Tumor Promoters. **Ann Rev Biochem**, v.60, p.281–319, 1991.

HESS, J.; ANGEL, P.; SCHORPP-KISTNER, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. **J Cell Sci**, v.1, n.117, p.:5965-5973, 2004.

HIRAI, S.I.; RYSECK, R.P.; MECHTA, F.; BRAVO, R.; YANIV, M. Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. **EMBO J.**, v. 8, n.5, p.1433-149, 1989.

HO M. M.; VINSON, G. P.; Peptide growth factors and the adrenal cortex. **Microsc. Res. Tech.**, v.36, n.6, p.558-568, 1997.

HOFFMAN, G.E.; LYO, D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out' **J Neuroendocrinol**, v.14, p.259-268, 2002.

HORNSBY, P.J. Regulation of adrenocortical cell proliferation in culture. **Endocr.Res.**, v.10, p.259-268, 1984.

HU, E.; MUELLER, E.; OLIVIERO, S.; PAPAIOANNOU, V.E.; JOHNSON, R.; SPIEGELMAN, B.M. Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. **EMBO J.**, v.13, p.3094-3103, 1994.

IMAI, T.; SEO, H.; MURATA, Y.; OHNO, M.; SATOH, Y.; FUNAHASHI, H.; TAKAGII, H.; MATSUI, N. Adrenocorticotropin increases expression of c-Fos and β -Actin genes in the rat adrenals. **Endocrinol.**, v.127, p. 1742-1747, 1990.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Adrenais In: Histologia Básica, 10ª Ed. Local: Editora Guanabara, Rio de Janeiro, p. 398-404, 2004.

JOCHUM, W.; PASSEGUÉ, E.; WAGNER, E.F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. **Oncogene**, v.20, p.2401-2412, 2001.

KARIN, M.; HUNTER, T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. **Curr Biol.** v.5, n.7, p.747-757, 1995.

KIMURA, T. Effects of hypophysectomy and ACTH administration on the level of adrenal cholesterol side-chain desmolase. **Endocrinol.**, v.85, n.3, p.492-499, 1969.

KIMURA, E; ARMELIN, H.A. Growth control in mouse Y-1 adrenocortical tumor cells: role of c-Ki-ras amplification and effects of ACTH. **Arch Biol Med Exp**, v. 21, p.435-441, 1988.

KIMURA, E.; ARMELIN, H.A. Phorbol ester mimics ACTH action in corticoadrenal cells stimulating steroidogenesis, blocking cell cycle, changing cell shape, and inducing c-fos proto-oncogene expression. **J Biol Chem.**, v.265, n.6, p.3518-3521, 1990.

KIMURA, E.; SONOBE, M.H.; ARMELIN, M.C.S.; ARMELIN, H.A. Induction of fos and jun proteins by adrenocorticotropin and phorbol éster but not by 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate derivatives. **Mol. Endocrinol.** v.7, p.1463-1471, 1993.

KOVARY, K.; BRAVO, R. Expression of different Jun and Fos proteins during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. **Mol Cell Biol.**, v.11, n.5, p. 2451-2459, 1991a.

KOVARY, K.; BRAVO, R. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. **Mol Cell Biol.**, v.11, n.9, p. 4466-4472 ,1991b.

LÁZAR-MOLNAR, E.; HEGYESI, H.; TÓTH, S.; FALUS, A. Autocrine and Paracrine regulation by Cytokines and Growth factors in melanoma. **Cytokine**, v.6, p.547-554, 2000.

LEHOUX, J.G., DUCHARME, L. *In vivo* effects of adrenocorticotropin on c-jun, jun-B, c-fos and fos-B in rat adrenal. **Endocr Res.**, v.21, p.267-274, 1995.

LOTFI, C.F.P.; TODOROVIC, Z.; ARMELIN, H.A.; SCHIMMER, B.P. Unmasking a growth promoting effect of ACTH in Y-1 mouse adrenocortical tumor cells. **J.Biol. Chem.**, v.272, p. 19886-19891, 1997.

LOTFI, C.F.; ARMELIN, H.A. cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. **J. Endocrinol.**, v.168, n.3, p.381-389, 2001.

MATTOS, G.E.; LOTFI, C.F.P. Differences between the growth regulatory pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 245, p. 31-42, 2005.

MATTOS, G.E.; POLLI, S.; JACYSYN, J.F.; AMARANTE-MENDES, G. P.; LOTFI, C.F.P. The grown promoting effect of ACTH and FGF2 in primary rat adrenal cells: the role of Jun proteins. (submetido, 2007)

MORGAN, J.I., CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annu Rev Neurosci.**, v.14, p.421-451,1991.

MOORE, C.C., MILLER, W.L. The role of transcriptional regulation in steroid hormone biosynthesis. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v.40, p. 517-525, 1991.

MULLER, R.; BRAVO, R.; BURCKHARDT, J.; CURRAN, T.; NEW, M.I. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. **Nature.** V.312, p.716-720, 1984.

NEW, M. I. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. **Annu Rev Med.**, v. 49, p. 311-328, 1988.

OGOSHIMA T, MITANI F, ISHIMURA Y. Isolation of aldosterone synthase cytochrome P-450 from zona glomerulosa mitochondria of rat adrenal cortex. **J Biol Chem.** V. 264, n.19, p.10935-10938, 1989.

PARDEE, A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci** v.71, n.4, p.1286-1290, 1974.

PARDEE, A. B. G1 Events and Regulation of Cell Proliferation. **Science.**v. 246, p. 603-608, 1989.

PASSEGUÉ, E., WAGNER, E.F. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16 (INK4a) expression. **EMBO J.** v.19, n.12, p. 2969-2979, 2000.

PENNYPACKER, K.R., HONG, J.S., DOUGLASS, J., MCMILLIAN, M.K. Constitutive expression of AP-1 transcription factors in the rat adrenal. Effects of nicotine. **J Biol Chem.**, v.267, n.28, p.20148-20152, 1992.

POWERS, C. J.; MCLESKEY, S. W.; WELLSTEIN, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. **Endocrine-related cancer.** V. 7, n.3, p.165-197, 2000.

PURVIS, J. L.; CANICK, J. A.; MASON, J. I.; ESTABROOK, K. W.; MCCARTHY, J. L. Lifetime of adrenal cytochrome p-450 as influenced by ACTH. **Academy Science.**, v.212, p.319-342, 1973.

REZZONICO R, LOUBAT A, LALLEMAND D, PFARR CM, FAR DF, PROUDFOOT A, ROSSI B, PONZIO G. Cyclic AMP stimulates a JunD/Fra-2 AP-1 complex and inhibits the proliferation of interleukin-6-dependent cell lines. **Oncogene**, v.11, n.6, p.1069-1078, 1995.

RYDER, K., NATHANS, D. Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors **Proc Natl Acad Sci**, v. 85, n.22, p.8464-8467,1988.

RYSECK, R.P.; BRAVO, R. cJun, JunB and JunD differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences; effect of Fos proteins. **Oncogene**, v.6, p. 533-542, 1991.

SPORN, MB, ROBERTS AB. Autocrine growth factors and cancer. **Nature.** V. 1985, n.313, p.745-747, 1985.

SCHUERMANN, M; JOOSS, K.; MULLER, R. FosB is a transforming gene encoding a transcriptional activator. **Oncogene.** V.6, p.567-576, 1991.

- SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature**. V.4, p.131-136, 2001.
- SCHWAB M, ALITALO K, VARMUS HE, BISHOP JM, GEORGE D. A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells. **Nature**, v.303, n.5917, p.497-501, 1983.
- SHERR, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. **Cell**, v. 79, n.4, p.551-555, 1994.
- SIMPSON, E. R.; WATERMAN, M. R. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. **Annual Review of Physiology**, v.50, p. 427–440, 1998.
- SMITH, M., BURKE, Z., CARTER, D. Tonic suppression of adrenal AP-1 activity by glucocorticoids. **Mol Cell Endocrinol**.v.122, n.2, p.151-158, 1996.
- TORRES, T. E. P.; LOTFI, C. F. P. Distribution of cells expressing Jun and Fos proteins and synthesizing DNA in the adrenal cortex of hypophysectomised rats: regulation by ACTH and FGF2. **Cell Tissue Res**. V.329, p.443-455, 2007.
- VIARD, I., PENHOAT, A., OUALI, R., LANGLOIS, D., BÉGEOT, M., SAEZ, J.M. Peptide hormone and growth factor regulation of nuclear proto-oncogenes and specific functions in adrenal cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.50, n.5-6, p.219-224, 1994.
- VIARD, I.; HALL, S. H.; JAILLARD, C.; BERTHELON, M. C.; SAEZ, J. M. Regulation of c-fos, c-jun and Jun-B messenger ribonucleic acids by Angiotensin-II and corticotropin in ovine and bovine adreno cortical cells. **Endocrinology**, v.430, n.3, p. 1193-1200, 1992.
- VOGT, P.K.; Jun, the oncoprotein. **Oncogene** v.20, p.2365-2377, 2001.
- WANG, H; WANG, J.Y; JOHNSON, L.R; SCOTT, R.E. Selective induction of c-Jun and JunB but not c-Fos or c-Myc, during mitogenesis in SV40-transformed cells at the predifferentiation growth arrest state. **Cell Growth Differ**. v.2, p.645-652, 1991.
- WESTON, C.R., DAVIS, R.J. The JNK signal transduction pathway. **Curr Opin Genet Dev**, v.12, n.1, p.14-21, 2002.
- WESTPHAL, C. H.; MULLER, L.; ZHOU, X.; BONNER-WEIR, S.; CHAMBELAN, M.; STEINER, D. F.; LINDBERG, I.; LEDER, P. The neuroendocrine protein 7B2 is required for peptide hormone processing in vivo and provides a novel mechanism for pituitary Cushing's disease. **Cell**, v.96, p.689-700, 1999.
- WILKINSON, D.G., BHATT, S., RYSECK, R.P., BRAVO, R. Tissue-specific expression of c-jun and junB during organogenesis in the mouse. **Development**. V.106, n.3, p.465-471, 1989.
- WISDON, R., JOHNSON, R.S., MOORE, C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. **EMBO J**. 18:188-197 (1999)
- WHITE, A., GIBSON, S. ACTH precursors; biological significance and clinic relevance. **Clin Endocrinol**. v.48, p.251-255, 1998.
- YANG, G., KOISTINAHO, J., ZHU, S.H., HERVONEN, A. Induction of c-fos-like protein in the rat adrenal cortex by acute stress--immunocytochemical evidence. **Mol Cell Endocrinol**.v.66, n.2, p.163-170, 1989.
- YASUMURA, Y., BUONNASSISSI, Y.; SATO, G. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and diploid karyotype **Cancer Res**, v.26, p.529-535, 1966.

YAYON, A., KLAGSBRUN, M., ESKO, J.D., LEDER, P., ORNITZ, D.M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. **Cell**. v.64, n.4, p.841-848, 1991.

YOUNG, M.R; LI, J.J; RINCON, M; FLAVELL, R.A. Transgenic mice demonstrate AP-1 transactivation is required for tumor promotion. **Proc Natl Acad Sci.**, v96, p.9827-9832, 1999.

ZAJCHOWSKI, D.A., BARTHOLDI, M.F., GONG, Y., WEBSTER, L., LIU, H.L., MUNISHKIN, A., BEAUHEIM, C., HARVEY, S., ETHIER, S.P., JOHNSON, P.H. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. **Cancer Res**. V.61, n.13, p. 5168-5178, 2001.

ZERIAL, M., TOSCHI, L., RYSECK, R.P., SCHUERMANN, M., MÜLLER, R., BRAVO, R. The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. **EMBO J**. v.8, n.3, p.805-813, 1989.