PEDRO OMORI RIBEIRO DE MENDONÇA

**EFEITOS *IN VIVO* DO ACTH E DO PEPTÍDEO N-POMC NA
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS E GENES RELACIONADOS
COM O CONTROLE DO CICLO CELULAR EM ADRENAIS
DE RATOS**

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

São Paulo
2012

PEDRO OMORI RIBEIRO DE MENDONÇA

**EFEITOS *IN VIVO* DO ACTH E DO PEPTÍDEO N-POMC NA
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS E GENES RELACIONADOS
COM O CONTROLE DO CICLO CELULAR EM ADRENAIS
DE RATOS**

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

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-
se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na
Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP
(BDTD).

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Mendonça, Pedro Omori Ribeiro de.

Efeitos *in vivo* do ACTH e do peptídeo N-POMC na expressão de proteínas e genes relacionados com o controle do ciclo celular em adrenais de ratos / Pedro Omori Ribeiro de Mendonça. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lofti.

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

Versão do título para o inglês: *In vivo* effects of ACTH and N-POMC peptide in the expression of proteins and genes related to cell cycle regulation in rat.

1. Córtex adrenal 2. Proliferação celular 3. Ciclo celular 4. Hormônio adrenocorticotrófico 5. Hormônios hipofisários I. Lofti, Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0157/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Pedro Omori Ribeiro de Mendonça.

Título da Tese: Efeitos *in vivo* do ACTH e do peptídeo N-POMC na expressão de proteínas e genes relacionados com o controle do ciclo celular em adrenais de ratos.

Orientador(a): Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lofti.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **156** nas fls. **112** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Claudimara Ferini Pacicco Lotfi**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo do ciclo celular de células da suprarrenal de ratos tratados com dexametona*" do qual participam o(s) aluno(s) **Pedro Omori Ribeiro de Mendonça, Paulo Roberto de Oliveira Castro**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **16.11.2011**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 23 de novembro de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

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

Aos Meus Pais, Eurico e Glória
À Minha Esposa, Deise

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã Sílvia, pelo incentivo e apoio.

À minha companheira de vida, minha esposa Deise, pelo amor e pela paciência ao longo desta jornada.

À Dra. Claudimara, pela dedicação e paciência desde os tempos de iniciação científica e pela valiosa orientação para desenvolver todo este trabalho.

À Profa. Dra. Maria Terêsa Machini e ao Dr. Cléber Lória do IQ-USP, pelo esforço em caracterizar os peptídeos e pelas valiosas sugestões e contribuições no trabalho.

À Dra. Maria Aparecida Juliano da UNIFESP, pelas sínteses dos peptídeos.

Aos Profs. Drs. Niels Olsen e Carlos Menck, pela utilização do PCR em tempo real.

À Profa. Dra. Patrícia Gama do ICB e sua equipe, pelas dicas valiosas do "western-blotting" e pelos anticorpos cedidos.

À Marta do laboratório de histologia do Depto. de anatomia do ICB, pelos ensinamentos e pela companhia durante os infinitos cortes histológicos.

À Profa. Dra. Patrícia Castelucci do Depto. de anatomia, pelo uso do microscópio de fluorescência e pelos anticorpos cedidos.

À Profa. Dra. Maria Luiza do Depto. de anatomia e à sua equipe, pela quantificação do RNA.

À Dra. Berenice Mendonça e à Dra. Helena da FM-USP, e à Dra. Marina Martinez e à técnica Vânia do HU-USP pelas quantificações do ACTH plasmático.

Ao Mário do CEFAP-ICB, pela assistência com as análises feitas no microscópio multi-fóton.

Aos meus colegas do laboratório, desde a minha iniciação científica, pelo apoio ao longo desta jornada.

Aos funcionários do Biotério do depto. de Anatomia, pelos cuidados com os animais de experimentação.

Ao Departamento de Anatomia do ICB, pela utilização de suas dependências.

À CAPES e ao CNPq.

À FAPESP, por todo o investimento financeiro.

Aos animais de experimentação.

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável" - Galileu Galilei

RESUMO

Mendonça POR. Efeitos *in vivo* do ACTH e do peptídeo N-POMC na expressão de proteínas e genes relacionados com o controle do ciclo celular em adrenais de ratos. [tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A proliferação das células do córtex adrenal é um fenômeno que depende do equilíbrio entre a expressão de genes e proteínas relacionadas com a progressão e a parada no ciclo celular. Um dos principais fatores envolvidos na proliferação do córtex adrenal é o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Entretanto, existem evidências que outros fatores como os peptídeos N-terminais da Pró-opiomelanocortina (N-POMC) possam também atuar na proliferação celular. Nosso objetivo foi contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta proliferativa do córtex adrenal desencadeada pelo ACTH e o peptídeo N-POMC. Foram analisados os efeitos proliferativos do ACTH e/ou N-POMC₁₋₂₈ em ratos cujo eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal) foi inibido com dexametasona através da: 1) localização e contagem do número de células que incorporaram bromodioxiuridina (BrdU), e que portanto entraram em fase S do ciclo celular, nas diferentes zonas do córtex; 2) análise da expressão proteica de marcadores da transição das fases G1→S do ciclo celular, como as ciclinas D e E e a proteína p27^{Kip1}, através das técnicas de imunoistoquímica e "immunoblotting" e 3) análise da regulação da expressão de genes relacionados com o ciclo celular, pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real em "array" em placas. Os resultados mostraram que o ACTH aumentou o número de células de incorporaram BrdU nas zonas mais internas do córtex, enquanto o peptídeo N-POMC aumentou essa marcação em todo o córtex adrenal. Ambos aumentaram a expressão proteica de ciclina D3 e E, respectivamente, nas regiões interna e externa da glândula e diminuíram a expressão de p27^{Kip1}. Esses peptídeos promoveram a inibição e aumento na expressão de genes relacionados com o ciclo celular com um padrão zona e tratamento-dependente. Esses resultados sugerem que o N-POMC₁₋₂₈ e o ACTH induzem a proliferação no córtex adrenal de maneira zona-específica, provavelmente mediada pela regulação da expressão das ciclinas D2, D3 e E, e do inibidor de ciclo celular p27^{Kip1}.

Palavras-chave: Córtex adrenal. Proliferação celular. Ciclo celular. Hormônio adenocorticotrófico. Pró-opiomelanocortina.

ABSTRACT

Mendonça POR. *In vivo* effects of ACTH and N-POMC peptide in the expression of proteins and genes related to cell cycle control in rat adrenals. [Ph. D. thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

The proliferation of adrenal cortical cells is a phenomenon that depends on the balance between the expression of genes and proteins related to the progression and arrest of the cell cycle. The main factor involved in the proliferation of the adrenal cortex is the adrenocorticotrophic hormone (ACTH). However, there are evidences showing that other factors such as the peptides N-terminal of Pro-opiomelanocortin (N-POMC) can also act in cell proliferation. The goal was to understand the mechanisms triggered for the proliferative effect promoted by ACTH and N-POMC peptide in the adrenal cortex. The proliferative effects of ACTH and / or N-POMC₁₋₂₈ in rats with HPA (Hypothalamic-pituitary-adrenal) axis inhibited by dexamethasone were analyzed through: 1) the localization and counting the number cells that incorporate bromodeoxyuridine (BrdU) in the different zones of the adrenal cortex; 2) protein expression analysis of proteins involved in the cell cycle G1 → S transition phase, such as cyclins D, cyclin E and p27^{Kip1} proteins, by immunohistochemistry and "immunoblotting" methods; 3) analysis of gene expression regulation related to cell cycle control, utilizing the technique of polymerase chain reaction in real time by using array-plates. The results showed that ACTH promoted an increase in the number of cells BrdU-positive in the inner zones of the cortex, while N-POMC increased positive-labeling cells in the entire adrenal cortex. Both peptides increased cyclin D3, and E protein expression, respectively, in the inner and outer fractions of the gland. In addition, the peptides decreased p27^{Kip1} protein expression. Both peptides promoted down-regulation and up-regulation of genes related to the control of cell cycle in a zone and treatment-dependent manner. These results suggest that N-POMC₁₋₂₈ and ACTH are mitogenic in a zone-specific manner the adrenal cortex. The regulation of cyclins D2, D3 and E expression, and the inhibitor of cell cycle the p27^{Kip1} protein could mediate this effect.

Keywords: Adrenal cortex. Cellular proliferation. Cell cycle. Adrenocorticotrophic hormone. Pro-opiomelanocortin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fotomicrografias de uma glândula adrenal de rato	23
Figura 2- O eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal do rato	25
Figura 3- Processamento da Pró-opiomelanocortina e o papel fisiológico dos peptídeos resultantes.....	27
Figura 4- A regulação do ciclo celular	31
Figura 5- Protocolo de incorporação de BrdU	41
Figura 6- Protocolo de tratamento com Dexametasona (DEX), ACTH e/ou N-POMC ..	45
Quadro 1- Lista das siglas e descrições dos genes analisados nas placas de PCR Array. Os genes foram agrupados em 7 categorias de acordo com o papel funcional previsto no ciclo celular	49
Figura 7- Estabelecimento da concentração Dexametasona e do tempo de tratamento dos peptídeos.....	54
Figura 8- Análise quantitativa do ACTH plasmático	55
Figura 9- Análise do efeito proliferativo dos peptídeos derivados da POMC por incorporação de BrdU – Entrada na fase S do ciclo celular	57
Figura 10- Incorporação de BrdU no córtex adrenal.....	58
Figura 11- Caracterização das frações obtidas pela dissecação das glândulas adrenais de rato	60
Figura 12- Expressão das proteínas ciclinas D1 e D2, após inibição do eixo HPA com DEX.....	62
Figura 13- Expressão da proteína ciclina D3 e P27Kip1 após inibição do eixo HPA com DEX.....	63
Figura 14- Expressão da proteína ciclina D1 nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos	65
Figura 15- Análise da expressão da proteína ciclina D2 nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos	67
Figura 16- Análise da expressão da proteína ciclina D3 nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos	69
Figura 17- Imunolocalização das proteínas ciclina D3 e PCNA expressas no córtex de adrenal de rato	70
Figura 18- Análise da expressão da proteína P27Kip1 nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos	72
Figura 19- Imunolocalização da expressão da proteína P27Kip1 no córtex adrenal de rato	73
Figura 20- Análise da expressão da proteína ciclina E1 nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos	75
Figura 21- Imunolocalização da expressão de ciclina E1	76
Figura 22- Expressão gênica do córtex adrenal após inibição do eixo HPA com DEX ..	78
Figura 23- Expressão gênica do córtex adrenal após tratamento com ACTH.....	80
Figura 24- Expressão gênica após tratamento com N-POMCMet.....	82
Figura 25- Expressão gênica após tratamento com N-POMCCys.....	84
Quadro 2- Genes relacionados ao controle do ciclo celular diferencialmente expressos na fração interna (FI) do córtex adrenal de ratos	97
Quadro 3- Genes relacionados ao controle do ciclo celular diferencialmente expressos na fração externa (FE) do córtex adrenal de ratos	97

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Análise de aminoácidos e do conteúdo peptídico dos peptídeos N-POMC utilizados	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrópico
ANOVA - Análise de variância
AP-1 - Proteína Ativadora 1 - Fator de Transcrição
β-END - Beta-Endorfina
BrdU - 5'-bromo-2'-deoxiuridina
BSA - Albumina sérica bovina
CAK - Quinase ativadora de CDK
cAMP - Monofosfato de adenosina cíclica
CDKI - Inibidor de CDK
CDK - Quinase dependente de ciclina
cDNA - DNA complementar
CREB - Elemento de ligação responsivo a cAMP
CRH - Hormônio liberador de corticotropina
Cyp11b1 - Enzima Citocromo P450 11-β hidroxilase
Cyp11b2 - Enzima Citocromo P450 aldosterona sintase
DAPI - 4'6'-diamidina-2-fenilindol
DAB - Diaminobenzidina
DEX - Dexametasona
DHEA - Deidroepiandrosterona
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etileno diamino tetra acético
ERK - Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
FE - Fração externa do córtex adrenal
FI - Fração interna do córtex adrenal
HRP - Peroxidase de raiz forte
IgG - Imunoglobulina G
INK4 - Inibidor de CDK4
i.p. - Intraperitoneal (injeção)
KIP - Proteína que interage com quinase
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
MC2R - Receptor de melanocortina 2
MSH - Hormônio estimulador de melanócito

N-POMC₁₋₂₈ - Peptídeo 1-28 da porção N-terminal da POMC

N-POMC^{Cys} - Peptídeo 1-28 da porção N-terminal da POMC, com as pontes dissulfeto

N-POMC^{Met} - Peptídeo 1-28 da porção N-terminal da POMC, com metioninas no lugar de cisteínas

N-POMC^{Ser} - Peptídeo 1-28 da porção N-terminal da POMC, com serinas no lugar de cisteínas

p.b. - Peso basal do animal

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PBSA - Solução salina tamponada com fosfato sem cálcio e magnésio

PC1/2 - Enzima Pró-proteína convertase 1/2

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PMSF - Fluoreto fenil metil sulfonil

POMC - Pró-opiomelanocortina

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RIPA - Tampão de ensaio de radio imuno precipitação - tampão de extração de proteínas

RNA - Ácido Ribonucleico

RNA_m - RNA mensageiro

rRNA - RNA ribossômico

SDS - Sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE - Sódio dodecil sulfato - Eletroforese em gel de poliacrilamida

TBST - Solução de tampão Tris acrescida de Tween 20

TH - Enzima tirosina hidroxilase

Y-1 - Células de carcinoma adrenocortical de camundongo

ZF - Zona Fasciculada

ZG - Zona Glomerulosa

ZR - Zona Reticulada

Ala (A) - Alanina

Arg (R) - Arginina

Asn (N) - Asparagina

Asp (D) - Ácido aspártico

Cys ou Cis (C) - Cisteína

Gln (Q) - Glutamina

Glu (E) - Ácido glutâmico

Gly ou Gli (G) - Glicina

His (H) - Histidina

Ile (I) - Isoleucina

Leu (L) - Leucina

Met (M) - Metionina

Phe ou Fen (F) - Fenilalanina

Pro (P) - Prolina

Ser (S) - Serina

Thr ou The (T) - Treonina

Trp ou Tri (Y) - Triptofano

Val (V) - Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 A glândula suprarrenal: aspectos anatômicos, histológicos e fisiológicos	20
1.2 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal	24
1.3 Os peptídeos derivados da Pró-opiomelanocortina que atuam no córtex adrenal	25
1.4 A proliferação celular no córtex da suprarrenal	29
1.5 O ciclo celular	30
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Peptídeos	37
3.2 Caracterização dos peptídeos quanto as análises de aminoácidos	38
3.3 O tratamento com Dexametasona (DEX)	39
3.4 Determinação do ACTH plasmático após a injeção i.p.	40
3.5 Incorporação de BrdU (5'-bromo-2'-dioxiuridina) para a análise das células que sintetizaram DNA – Reação imunohistoquímica por peroxidase	40
3.6 Processamento das glândulas para obtenção das frações externa e interna da glândula adrenal	42
3.7 Preparação do lisado protéico das frações das glândulas adrenais	42
3.8 "Immunoblotting"	43
3.9 Protocolo de imunoprecipitação para a detecção de ciclina E1	44
3.10 Tratamentos com ACTH e/ou N-POMCs	45
3.11 Protocolo de imunoistoquímica	46
3.12 Protocolo para a extração do RNA total das frações das glândulas adrenais	47
3.13 Protocolo para o PCR em tempo real e análise dos dados	47
3.14 Análises Estatísticas	48
4 RESULTADOS	52
4.1 Resultados da eficiência do tratamento com a DEX para a depleção do ACTH circulante	53
4.2 Detecção do ACTH plasmático após injeção i.p.	54

4.3 Análise da incorporação de BrdU em animais tratados com Dex e peptídeos derivados da POMC	55
4.4 Caracterização da fração interna (FI) e da fração externa (FE) da glândula	59
4.5 Expressão proteica das ciclinas D e P27^{Kip1} no córtex adrenal	60
4.5.1 <i>Inibição do eixo HPA através da ação da DEX</i>	60
4.5.2 <i>Efeitos dos peptídeos derivados da POMC na expressão da proteína ciclina D1</i>	64
4.5.3 <i>Efeitos dos peptídeos derivados da POMC na expressão de ciclina D2</i>	66
4.5.4 <i>Efeitos dos peptídeos derivados da POMC na expressão de ciclina D3.....</i>	68
4.5.5 <i>Efeitos dos peptídeos derivados da POMC na expressão P27^{Kip1}</i>	71
4.6 Expressão proteica da ciclina E1 no córtex adrenal	74
4.7 Análise da expressão gênica dos genes relacionados com o ciclo celular.....	77
4.7.1 <i>Expressão gênica após inibição do eixo HPA</i>	77
4.7.2 <i>Efeitos do ACTH na expressão gênica.....</i>	79
4.7.3 <i>Efeitos do N-POMC^{Met} na expressão gênica</i>	81
4.7.4 <i>Efeitos do N-POMC^{Cys} na expressão gênica.....</i>	83
5 DISCUSSÃO	85
5.1 Estabelecimento do modelo experimental - inibição do eixo HPA	86
5.2 Análise da proliferação <i>in vivo</i>.....	87
5.3 O mecanismo de ação do ACTH e N-POMC através da análise da expressão das proteínas de ciclo celular: a expressão proteica das ciclinas e de p27^{Kip1}	91
5.4 Os mecanismos de ação dos peptídeos através da análise da expressão dos genes reguladores do ciclo celular	96
6 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS.....	104
APÊNDICES	113
APÊNDICE A - Artigo Torres et al 2010	113
APÊNDICE B - Artigo Mendonca e Lotfi 2011	126
APÊNDICE C - Artigo Mendonca et al 2012.....	133
APÊNDICE D - Esquemas de conclusão.....	142

1 INTRODUÇÃO

1.1 A glândula suprarrenal: aspectos anatômicos, histológicos e fisiológicos

A glândula suprarrenal foi descrita anatomicamente por Bartholomeu Eustachius em 1563, mas somente em 1714 essa descrição foi publicada por Lancisius em *Tabulae Anatomicae* (ORTH; KOVACS, 1998). Entretanto, até o ano de 1855 a função fisiológica das glândulas suprarrenais permaneceu desconhecida. Thomas Addison foi o primeiro médico a relacionar uma série de observações clínicas, como a irritabilidade e a mudança na cor da pele, com anormalidades morfológicas das glândulas suprarrenais reveladas nas autópsias. Posteriormente, a doença descrita por ele foi batizada com o seu nome. A denominação *adrenal* começa aparecer na língua inglesa a partir de 1875, logo a duplicidade de nomes para a glândula torna-se comum nas publicações médicas. Apesar de ser mais adequada a denominação adrenal em animais quadrúpedes, como o rato, nós iremos utilizar também o termo suprarrenal para os ratos.

No homem, as glândulas suprarrenais estão situadas em posição retroperitonal, de cada lado da coluna vertebral no pólo superior dos rins. A fáscia renal reveste as glândulas juntamente com o respectivo rim (DANGELO; FATINI, 2007). A irrigação das glândulas é feita por três pedículos arteriais: as artérias suprarrenal superior, média e inferior. A drenagem venosa do córtex e da medula é feita por uma única veia suprarrenal. Enquanto a veia suprarrenal direita desemboca diretamente na veia cava inferior, a veia suprarrenal esquerda desemboca na veia renal esquerda e então na veia cava inferior (DANGELO; FATINI, 2007).

No rato, as suprarrenais apresentam coloração castanha e estão localizadas lateralmente à coluna vertebral na cavidade abdominal, sendo circundadas pela gordura retroperitonal, estando próximas ao pólo cranial de cada rim e aderidas ao aspecto ventral dos músculo sublombares. São irrigadas por dois pedículos arteriais: as artérias suprarrenal superior e inferior. As ramificações dessas artérias, tanto em ratos quanto em humanos, formam um plexo na região subcapsular no qual se originam vasos arteriais que vão irrigar as zonas mais internas do córtex e a medula adrenal (POPESKO; REJTOVÁ; HORAK, 2002).

As glândulas adrenais são revestidas por uma cápsula conjuntiva são formadas por dois diferentes tecidos: o tecido cortical (córtex adrenal) e o medular (medula adrenal), com origens e funções diferentes, caracterizando dois órgãos

distintos. O córtex se origina do epitélio celômico (mesodérmico), e a medula da crista neural (neuroectodérmica). As células formadoras do córtex derivam do revestimento mesotelial da parede abdominal posterior. A formação do córtex adrenal começa com a condensação das células do epitélio celômico, formando o trato urogenital, a mesma estrutura que vai originar os rins e as gônadas. A partir deste ponto, grupos celulares se diferenciam e começam a expressar, dentre outras proteínas, o fator esteroideogênico-1 (Sf1), formando assim o primórdio adrenogonadal. Dentre as células que compõem este primórdio, algumas irão se diferenciar e originar o córtex adrenal através da expressão de algumas proteínas já conhecidas, como a beta-catenina e a "sonic-hedgehog" (SIMON; HAMMER, 2012; WOOD; HAMMER, 2011;). Em seguida, há a completa distinção do córtex adrenal fetal e das gônadas, ambas provenientes do primórdio adrenogonadal. As células da adrenal fetal continuam o desenvolvimento formando duas zonas distintas, a zona fetal (mais interna) e a definitiva (mais externa). Já as células que originam a medula derivam de um gânglio simpático adjacente que, por sua vez, é derivado da crista neural. Em um determinado momento do desenvolvimento da glândula as células que vão dar origem a medula invadem o primórdio adrenal e migram para o centro do órgão, formando um aglomerado celular que vai originar a medula adrenal. Posteriormente, por volta da nona semana de gestação, este primórdio adrenal é completamente envolto por células de origem mesenquimal que darão origem à cápsula adrenal (MOORE; PERSAUD, 2008). No homem, a formação de um córtex definitivo contendo as três zonas distintas se dá ao longo do restante da gestação e principalmente após o nascimento (para revisão LALLI, 2010).

A camada medular é formada principalmente por células poliédricas chamadas de cromafins que se dispõem em cordões e formam uma densa rede onde há capilares e vênulas. Essa porção da glândula é innervada por fibras simpáticas colinérgicas pré-ganglionares, através dos nervos esplâncnicos abdominais, pélvicos e ramos do plexo celíaco. A função básica da medula adrenal é produzir e secretar adrenalina e noradrenalina após estímulos nervosos. O córtex da suprarrenal é formado por três zonas celulares concêntricas (Figura 1):

A zona glomerulosa (ZG), localizada mais externamente no córtex, logo abaixo da cápsula, com células dispostas em grupamentos globosos ou aciformes envolvidos por capilares, é responsável pela produção e secreção de hormônios chamados de mineralocorticóides, associados com a homeostase de eletrólitos no

plasma sanguíneo. Dentre eles, destaca-se a aldosterona que promove a reabsorção de sódio e a excreção de potássio nos rins, sendo sua liberação controlada pelo sistema renina-angiotensina, pelo nível de potássio plasmático e pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH).

A zona fasciculada (ZF) corresponde à parte intermediária do córtex, sendo a maior das três zonas. É formada por células poliédricas que contêm grande número de gotículas lipídicas em seu citoplasma e são arranjadas na forma de colunas paralelas, intercaladas com capilares. Esta zona secreta hormônios relacionados com o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, chamados de glicocorticóides, que estimulam a gliconeogênese. A secreção de corticosterona em roedores, ou de cortisol no homem, é regulada principalmente pelo ACTH.

A zona reticulada (ZR), região mais interna do córtex, adjacente à camada medular, apresenta uma estrutura tridimensional em forma de redes entrelaçadas. As células que compõem esta zona são menores que das demais zonas, com um citoplasma contendo pequenas quantidades de lipídeos. As células da ZR realizam a síntese e secreção de hormônios andrógenos e estrogênios, sendo a deidroepiandrosterona (DHEA) o único hormônio sexual produzido pelo córtex de alguns animais, em quantidade fisiologicamente significativa. Entretanto, em ratos não ocorre a produção de DHEA no córtex adrenal, uma vez que o gene que codifica a enzima Citocromo P450 17- α -hidroxilase não está presente (LE GOASCOGNE et al., 1991). Logo, esta zona em murinos, assim como a ZF, secreta corticosterona.

Figura 1- Fotomicrografias de uma glândula adrenal de rato

Fotomicrografias representativas da glândula adrenal de rato. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. **a)** Glândula adrenal com o córtex e a medula (4X). **b)** Córtex adrenal (20X). **c)** Zona Glomerulosa - ZG (100x). **d)** Zona Fasciculada - ZF (100x). **e)** Zona Reticulada - ZR (100x).

Fonte: Adaptado de Torres, 2008.

1.2 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal

As glândulas suprarrenais tem como função básica manter a homeostase do organismo. Uma grande variedade de estímulos, fisiológicos e patológicos, provoca alteração do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (eixo HPA em inglês "Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis"). Os estímulos provenientes de diversas áreas do sistema nervoso fazem com que as células dos núcleos hipotalâmicos paraventricular e supraóptico secretem vasopressina e o hormônio liberador de corticotropina (CRH) (ORTH; KOVACS, 1998). O CRH chega à hipófise por meio de um sistema porta hipotalâmico-hipofisário e estimula os corticotrófos, localizados na adeno-hipófise, a produzir e liberar ACTH. Este hormônio é reconhecido por receptores específicos presentes nas células do córtex adrenal, chamados de MC2R, que uma vez ativados desencadeiam uma sinalização para a produção de corticosteróides. O eixo HPA é então inibido quando existem altas concentrações de cortisol na corrente sanguínea, de maneira que, por efeito de retroalimentação negativa, este esteroide chega ao hipotálamo e à adeno-hipófise e inibe, respectivamente, a produção de CRH e de ACTH (para revisão, PAPADIMITRIOU; PRIFTIS, 2009) (Figura 2).

Figura 2- O eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal do rato

Esquema do eixo HPA mostrando o efeito de retroalimentação negativa. CRH: Hormônio Liberador de Corticotropina; ACTH: Hormônio Adrenocorticotrópico; AVP: arginina vasopressina.

Fonte: Adaptado de Chrousos, 2004.

1.3 Os peptídeos derivados da Pró-opiomelanocortina que atuam no córtex adrenal

A Pró-opiomelanocortina (POMC) é um pró-hormônio de 261 aminoácidos produzida pela hipófise que, após processamento pós-traducional em sítios específicos, resulta na produção de vários peptídeos menores, dentre eles hormônios peptídeos com diferentes funções fisiológicas. É uma proteína derivada de um gene altamente preservado ao longo da evolução, presente desde os peixes agnatas até os mamíferos (KAWAUCHI; TAKAHASHI; ABE, 1981).

As enzimas responsáveis pelas clivagens da molécula precursora são chamadas de pró-hormônio convertases (PC) de dois tipos, PC1 e PC2, expressas respectivamente nos lobos anterior e intermediário da hipófise. Como resultado das clivagens, é produzida a corticotropina (ACTH), a lipotropina (LPH), o "Joining Peptide" (JP), o hormônio estimulador de melanócitos (MSHs) e a beta-endorfina (β -

END). Além desses peptídeos, a POMC produz o peptídeo 1-76 da região N-terminal, o N-POMC₁₋₇₆ ou também chamada de pré- γ -MSH no lobo anterior da hipófise, que por sua vez pode sofrer, no lobo intermediário, uma clivagem que resulta no peptídeo 1-49 N-terminal, o N-POMC₁₋₄₉, além de outros peptídeos (para revisão, BICKNELL, 2008) (Figura 3).

Figura 3- Processamento da Pró-opiomelanocortina e o papel fisiológico dos peptídeos resultantes

Processamento da pró-opiomelanocortina (POMC) nos lobos anterior e intermediário da hipófise e o papel fisiológico dos peptídeos resultantes. Os peptídeos derivados da POMC agem principalmente via receptores do tipo acoplado à proteína G, denominados receptores de melanocortina (MCX-R, onde X é um número entre 1-5). β-endorfina atua via receptores opióides κ e μ, e o receptor pelo qual os peptídeos N-terminais estimulam a mitose na adrenal permanece desconhecido. ACTH, Hormônio adrenocorticotrófico; CLIP, Peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotropina ; LPH, lipotropina; MSH, Hormônio estimulador de melanócitos. Fonte: Adaptado de Bicknell, 2008.

O ACTH é um hormônio peptídico de cadeia simples formado por 39 aminoácidos, muito preservado nos mamíferos, sendo que somente um resíduo difere o ACTH do homem do rato. Uma vez na corrente sanguínea o ACTH atinge a suprarrenal e estimula a produção de esteroides, como o cortisol em humanos e os corticosteroides em murinos. O receptor do ACTH (MC2R) é uma proteína transmembrânica associada à proteína G que, na forma ativada, aumenta a concentração intracelular de AMP cíclico (cAMP) através da enzima adenilato ciclase, que por sua vez estimula a via PKA, uma proteína quinase ativada por cAMP que fosforila o elemento de ligação responsivo a cAMP (CREB) que se liga ao promotor de genes responsáveis pela esteroidogênese.

A ação esteroidogênica do ACTH no córtex suprarrenal está bem estabelecida (SCHIMMER, 1980), o mesmo não acontecendo com o efeito do ACTH na manutenção do córtex, isto é, no equilíbrio entre a proliferação, diferenciação e morte celular. Por um lado, estudos demonstram que altos níveis de ACTH circulante promovem um aumento do número (hiperplasia) e no tamanho (hipertrofia) das células do córtex da suprarrenal no homem (NEW, 1998) e em murinos (DALLMAN, 1984). Por outro lado, experimentos utilizando ratos infundidos com anticorpo anti-ACTH, para neutralizar o ACTH circulante, mostraram redução nos níveis de esteroides, mas não atrofia da glândula adrenal, sugerindo que outros peptídeos derivados da POMC possam atuar na proliferação da glândula adrenal (ESTIVARIZ et al., 1982; RAO; LONG; RAMACHANDRAN, 1978).

O peptídeo pró- γ -MSH foi sugerido como a provável região da POMC que poderia exercer um efeito trófico na adrenal, mas tanto em ratos hipofisectomizados como tratados com dexametasona (DEX) esse peptídeo não apresentou efeito mitogênico na adrenal (SEIDAH; CHRÉTIEN, 1981). Entretanto, os resultados foram bem diferentes quando peptídeos menores, sem a porção γ -MSH, produzidos através de digestão do pró- γ -MSH por tripsina ou extraídos de hipófises de cadáveres, foram testados na adrenal. Estivariz et al. (1982) demonstraram que estes peptídeos menores induziam mitoses em culturas de células de adrenais de ratos, enquanto que o ACTH não tinha este efeito. Dentre os peptídeos N-POMC isolados dos extratos de hipófises, o que se mostrou mais eficaz em induzir a mitose *in vitro* foi o N-POMC 1-28. Curiosamente, este peptídeo N-POMC isolado foi resultante de uma degradação de peptídeos maiores, mas o fato de desencadear

uma resposta biológica *in vitro* e *in vivo* nas células adrenocorticais aliada à maior viabilidade de sintetiza-lo e purifica-lo, permitiu que estudos posteriores sobre o seu efeito fossem realizados. Lowry et al. (1983) comprovaram, através de um série de experimentos utilizando anticorpos específicos para neutralizar os peptídeos derivados da POMC, que os peptídeos da porção mais N-terminal da POMC são capazes de promover a proliferação das células adrenocorticais *in vivo*. Logo, uma vez que a porção N-terminal da POMC que contém o γ -MSH não é mitogenica na adrenal, e que o precursor pró- γ -MSH é a principal forma presente na circulação, surge a hipótese de que é necessária uma clivagem do pró- γ -MSH tecido-específica para que sejam liberados os peptídeos menores N-terminais, e estes sim estimularem a proliferação das células adrenocorticais (LOWRY et al., 1983). De fato, Bicknell et al. (2001) caracterizaram uma enzima serina protease, presente na matriz extracelular das células adrenais, responsável por clivar o pró- γ -MSH, liberando um peptídeo menor (52 resíduos), capaz de estimular a proliferação das células do córtex adrenal.

1.4 A proliferação celular no córtex da suprarrenal

A proliferação celular no córtex adrenal ocorre para manutenção e renovação das células bem como em resposta a vários e específicos estímulos. Apesar de existirem diversas teorias sobre como ocorre a renovação e a morte das células que compõem o córtex adrenal, hoje em virtude dos avanços das técnicas de transgenia e "knock-out" tecido-específico, a teoria mais aceita para explicar esse fenômeno afirma que as células menos diferenciadas estão localizadas tanto na cápsula quanto na região sub-capsular ou mesmo entre as células que compõem a zona glomerulosa da glândula, e que elas são as células progenitoras do restante do córtex. Uma vez estimuladas a se diferenciar, essas células migram centripetamente e se diferenciam em células do córtex adrenal (MORLEY et al., 1996; WOOD; HAMMER, 2011).

1.5 O ciclo celular

Quando hormônios e fatores de crescimento se ligam aos receptores específicos, inicia-se 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. O ciclo celular consiste em uma série de eventos coordenados que levam a célula a iniciar o processo de divisão celular. Cada um desses eventos corresponde à ativação de respostas específicas que caracterizam as diferentes fases do ciclo celular (SHERR; ROBERTS, 2004). A mitose e a citocinese, em conjunto, constituem a chamada fase M do ciclo, onde ocorre de fato a separação de duas células filhas a partir de uma célula mãe. O intervalo entre duas mitoses, chamado de interfase, pode ser compreendido como uma série de eventos preparatórios, sendo dividida em 4 fases: G0, G1, S e G2 (Figura 4).

Figura 4- A regulação do ciclo celular

Esquema do ciclo celular, com ênfase nos controles exercidos pelas ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (Cdks) e os inibidores das Cdks (p15, p16, p21, p27). G1 - Intervalo 1; S - Síntese de DNA; G2 - Intervalo 2; M - Mitose.

Os genes de resposta primária são importantes para o desencadeamento de estímulos para a saída de G0 e entrada em G1 do ciclo celular, enquanto os genes de resposta secundária, após serem induzidos pelas proteínas dos genes de resposta primária, são importantes entre a fase tardia de G1 e a passagem de G1/S do ciclo celular, como também nas fases seguintes à S, G2 e M. Dentre as proteínas envolvidas na passagem de G1/S do ciclo celular estão as ciclinas, as quinases dependentes de ciclina (Cdk) e as proteínas inibidoras dessas quinases, chamadas proteínas inibidoras de Cdk (CKIs) (para revisão, VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

As ciclinas são proteínas expressas em determinadas fases do ciclo celular, com meia-vida regulada e rápida que, sozinhas, não tem atividade, mas são imprescindíveis para progressão do ciclo celular (REDDY, 1994; SHERR, 1994). As ciclinas são classificadas em ciclinas A, B, D e E, e estão relacionadas com as diferentes fases do ciclo celular. Para que ocorra a atividade das ciclinas é necessário que haja uma associação com as Cdks. Essas por sua vez podem ser de sete tipos diferentes e estão sempre presentes na forma não funcional. O complexo ciclina/Cdk precisa ser fosforilado por uma quinase ativadora de Cdks (CAK) e só assim estará totalmente ativo para que possa atuar na fosforilação de outras proteínas, como por exemplo, a proteína do retinoblastoma (Rb), o que permite a progressão do ciclo celular (para revisão, VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

A ciclina D apresenta três subtipos D1, D2 e D3 que se associam com as Cdks do tipo 4 e 6, sendo responsável pela transição entre G1→S juntamente com a ciclina E, apesar dessas proteínas regularem eventos diferentes nessa transição (RESNITZKY; REED, 1995). As células de mamíferos mantêm uma regulação da progressão do ciclo celular finamente controlada e, para que ocorra a transição entre G1→S, é necessário que ocorram três etapas de regulação gênica e protéica (para revisão, SHERR; ROBERTS, 1999): a primeira é predominantemente a regulação de genes de resposta primária (por exemplo a formação dos complexos AP-1); a segunda é a transcrição e tradução das ciclinas D; a terceira e última é a regulação gênica e protéica das ciclinas E. Os fatores mitogênicos e anti-mitogênicos podem atuar principalmente na regulação das duas primeiras etapas. O aumento no número de complexos ciclina D / Cdk ativos promovido por estes estímulos resulta em uma maior taxa de fosforilação de Rb e, conseqüentemente, na maior liberação do fator de transcrição E2f, essencial para a progressão do ciclo celular. Logo, diferente das outras ciclinas que são periodicamente induzidas durante a progressão do ciclo celular, os níveis de ciclinas D são controlados por fatores mitogênicos no meio extracelular. Por esta razão acredita-se que as ciclinas D sirvam como uma ponte entre o meio extracelular e a maquinaria do ciclo celular (SHERR; ROBERTS, 1999).

Por outro lado os complexos ciclina/CDK podem ser inibidos com a ação das proteínas inibidoras de CDK (CKIs). As CKIs são proteínas de baixo peso molecular e que podem ser divididas em duas subclasses pela maneira como inibem as proteínas Cdks: 1- as proteínas do grupo das INK4 (Inhibitors of Cdk4), formadas

pelas proteínas p15, p16, p18 e p19 que se associam as Cdks do tipo 4 e 6, impedindo-as de formar o complexo com as ciclina D; 2- as proteínas do grupo KIP ("Kinase-interacting protein"), formadas pelas proteínas p21, p27 e p57 que se ligam ao complexo já formado impedindo a sua atividade (HALL; BATES; PETERS, 1995; MORGAN, 1995).

O aumento das CKIs p15, p16, p21 e p27 inibe a atividade da ciclina D impedindo que a célula prossiga no ciclo celular. A ciclina E se associa com outra isoforma de Cdk, a Cdk2, responsável pela interface G1/S cuja inibição é feita pela CKI p21. As ciclinas A e B estão relacionadas à progressão e transição entre as fases S→G2→M, e encontram-se ativadas quando associadas à Cdk do tipo 1 e 2 e inibidas com o aumento da p21. A ciclina A por sua vez, exerce um papel essencial para a progressão no ciclo celular como um componente regulatório de Cdk2, sendo que no final de G1 há um acúmulo da proteína e do mRNA dessa ciclina.

A proteína p27^{Kip1} é expressa ao longo de todo o ciclo o celular e é considerada um importante regulador do ciclo, uma vez que este inibidor de CDK da família Kip pode se complexar com CDK4-6/Ciclina D e CDK2/Ciclina E e inativá-los, o que resulta em um efeito inibitório da progressão no ciclo celular (RAY et al., 2009). O nível de expressão de p27^{Kip1} pode diminuir quando a célula progride de um estado quiescente, em função de uma degradação mediada por ubiquitinação. Esta degradação promove a progressão do ciclo celular. Os efeitos das fosforilações em diferentes resíduos da molécula de p27 foram caracterizados *in vivo* e parecem afetar sua localização celular, ubiquitinação e atividade inibitória ou não (CHU et al., 2007).

Apesar de existirem poucos estudos sobre a regulação do ciclo celular em células adrenocorticais após estímulos proliferativos, sabemos que é necessário entender melhor estes mecanismos básicos de manutenção da glândula adrenal, uma vez que em patologias da glândula, como os tumores, os mecanismos de controle do ciclo estão desregulados. Logo, a hipótese testada nesse trabalho foi que fatores provenientes da POMC, como o ACTH e os peptídeos N-POMC, que estimulam a proliferação do córtex adrenal, utilizam como mecanismo de ação a modulação de genes e a expressão de proteínas relacionados ao controle do ciclo celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer os mecanismos da ação proliferativa dos peptídeos derivados da POMC, especificamente o ACTH e o N-terminal da POMC, no córtex de adrenal de rato.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o protocolo de tratamento com DEX para inibir o eixo HPA de ratos, através de quantificação do ACTH plasmático;
- avaliar e comparar o efeito proliferativo de peptídeos sintéticos, com diferentes características estruturais, que são derivados da POMC, através da análise da incorporação de BrdU nas glândulas adrenais de ratos, previamente tratados com DEX;
- avaliar e comparar a expressão das proteínas da família das ciclinas e seus inibidores no córtex adrenal de ratos previamente tratados com DEX, ACTH e peptídeos N-POMC, através de immunoblotting ou imunoistoquímica;
- avaliar e comparar a expressão de genes relacionados ao controle do ciclo celular no córtex adrenal de ratos previamente tratados com DEX e ACTH e peptídeos N-POMC, através de RT-PCR "array".

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Peptídeos

Neste trabalho nós utilizamos o hormônio ACTH₁₋₃₉ humano sintético (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) em concentração farmacológica de 100nM (10^{-7} M).

Foram utilizados três peptídeos sintéticos 1-28 N-terminal da POMC (N-POMC) distintos nas concentrações de 10^{-7} M ou 10^{-9} M:

N-POMC^{Cys}: a sequência de aminoácidos sintetizada foi: *H*-Trp-**Cys(2)**-Leu-Glu-Ser-Ser-Gln-**Cys(8)**-Gln-Asp-Leu-Thr-Thr-Glu-Ser-Asn-Leu-Leu-Ala-**Cys(20)**-Ile-Arg-Ala-**Cys(24)**-Arg-Leu-Asp-Leu-OH. Esse peptídeo contém duas pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína 2-24 e 8-20. A síntese foi realizada pelo laboratório Bachem (Torrance, CA, EUA), sendo que a pureza de síntese foi de 95%.

N-POMC^{Met}: a sequência de aminoácidos sintetizada foi: *H*-Trp-**Met(2)**-Leu-Glu-Ser-Ser-Gln-**Met(8)**-Gln-Asp-Leu-Thr-Thr-Glu-Ser-Asn-Leu-Leu-Ala-**Met(20)**-Ile-Arg-Ala-**Met(24)**-Arg-Leu-Asp-Leu-NH₂. Os resíduos de metionina substituíram os de cisteína, prevenindo a formação das pontes dissulfeto. A síntese do peptídeo N-POMC^{Met} foi realizada pelo laboratório do Departamento de Biofísica e Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo, liderado pela Profa. Dra. Maria Aparecida Juliano. Uma vez que, segundo a Dra. Juliano, tecnicamente não era possível sintetizar o peptídeo de maneira correta com as pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína, nos foi sugerida a substituição por um aminoácido apolar, no caso a metionina, com o intuito de preservar o elemento enxofre na cadeia lateral. Portanto, essa substituição teve como finalidade evitar a formação de peptídeos atípicos quando as cisteínas são mantidas sem as pontes.

N-POMC^{Ser}: a sequência de aminoácidos sintetizada foi: *H*-Trp-**Ser(2)**-Leu-Glu-Ser-Ser-Gln-**Ser(8)**-Gln-Asp-Leu-Thr-Thr-Glu-Ser-Asn-Leu-Leu-Ala-**Ser(20)**-Ile-Arg-Ala-**Ser(24)**-Arg-Leu-Asp-Leu-OH. Os resíduos de serina substituíram os de cisteína, impedindo a formação das pontes dissulfeto. A síntese foi realizada pelo laboratório Bachem, sendo que a pureza de síntese foi de 95%.

3.2 Caracterização dos peptídeos quanto as análises de aminoácidos

O conteúdo peptídico e as análises de aminoácidos foram realizadas em todos peptídeos, independente do fornecedor, com a colaboração da Profa. Dr. Maria Terêsa Machini do Laboratório de Química de Peptídeos do IQ-USP. O conteúdo peptídico foi determinado por hidrólise ácida seguida de análise dos aminoácidos do hidrolisado, conforme mostra a Tabela 1. Os peptídeos purificados permaneceram por 24 h a 110 °C em uma solução de 6 N de ácido clorídrico e fenol (Sigma) sob uma atmosfera de nitrogênio em uma estação de trabalho Waters Pico-Tag (Millipore, CA, EUA). Os hidrolisados resultantes tiveram o ácido e fenol removidos através de vácuo e pastilhas de hidróxido de potássio, e foram analisados em analisador de aminoácidos (Dionex, CA, EUA) composto por um amostrador automático AS40, uma bomba quaternária GS50, um forno de coluna LC25, uma coluna de troca iônica 2x250 mm PA10 AminoPac e um detector eletroquímico ED50. Este sistema empregou as seguintes fases móveis: água, 0.25 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio, 1.0 mol L⁻¹ de acetato de sódio e 0.1 mol L⁻¹ de ácido acético. A eluição e detecção foram baseados no método proposto por Clarke et al. (1999). Os dados obtidos estava de acordo com os dados teóricos. Eles permitiram que fosse feita uma estimativa do conteúdo peptídico, que foi calculado a partir de uma amostra de aminoácidos estáveis até a condição de hidrólise comparada com uma quantidade de peptídeo completamente hidrolisado.

Tabela 1- Análise de aminoácidos e do conteúdo peptídico dos peptídeos N-POMC utilizados

Peptídeo	Sequência de Aminoácidos	Análise de Aminoácidos Esperado (achado) ^a	Conteúdo Peptídico ^b (%)
N-POMC^{Ser}	H-WSLESSQSQDLTTESNLLASIRASRLDL-OH	R 2.0(2.0), A 2.0(1.7), T 2.0(1.5), S 7.0(5.0), I 1.0(0.8), L 6.0(5.1), Q/E 4.0(3.0), D/N 3.0(2.0), W 1.0(ND)	56
N-POMC^{Met}	H-WMLESSQMQLTTESNLLAMIRAMRLDL-NH ₂	R 2.0(2.0), A 2.0(2.0), T 2.0(1.9), S 3.0(2.7), I 1.0(0.9), L 5.2(6.0), M 4.0(2.8), Q/E 4.0(3.5), D/N 3.0(2.4), W 1.0(ND)	54
N-POMC^{Cys}	H-WCLESSQCQDLTTESNLLACIRACRLDL-OH	R 2.0(2.0), A 2.0(2.3), T 2.0(2.1), S 3.0(3.3), I 1.0(1.1), L 6.0(7.7), Q/E 4.0(3.9), D/N 3.0(2.4), C 4.0(1.5)	79

ND: Não detectado. Aminoácido usado para cálculo das proporções molares dos aminoácidos: **R**.^a Sob condição de hidrólise **S**, **M** e **T** são parcialmente destruídos. **W** é completamente destruído.^b Aminoácidos utilizados como referência: R, A, I, L, Q/E, D/N.

3.3 O tratamento com Dexametasona (DEX)

Foram utilizados ratos machos da linhagem Sprague-Dowley adultos com 200-250 g e idade aproximada de 50 dias. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz de 12/12 h (início do claro às 7 h), ar e temperatura (22 °C) e com ração e água *ad libitum*. Para determinar a concentração e o tempo de tratamento ideal com a (DEX) (Decadron Injetável - Ache Laboratórios, Brasil), os animais foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com DEX 10, 50 ou 100 µg / 100 g peso do animal por dois dias sempre no período entre 8 e 9 horas da manhã. Passadas 24, 32 ou 48 horas após a última injeção, foram sacrificados e o sangue coletado em tubos contendo 3,8% de EDTA (USB, Cleveland, OH, EUA). As amostras foram centrifugadas (10.000 rpm a 4 °C por 15 minutos), o sobrenadante recolhido e estocado em freezer -80 °C para a dosagem do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) circulante. O ACTH circulante foi dosado por ensaio de quimiluminescência (Immulite; Diagnostic Products Corporation-DPC, Los Angeles, CA, EUA) no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário da USP, sob a responsabilidade da Profa Dra Marina Baquerizo Martinez.

3.4 Determinação do ACTH plasmático após a injeção i.p.

Com o intuito de dosar a concentração plasmática de ACTH após uma única injeção i.p. do mesmo, ratos foram tratados por dois dias com DEX (50 µg/100 g P.B.) e uma única injeção (i.p.) com ACTH (10^{-7} M) após 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Após o sacrifício, o sangue foi coletado e processado conforme descrito acima. A dosagem do ACTH plasmático desta série de experimentos foi realizada utilizando o mesmo ensaio de quimioluminescência (Immulite), porém as amostras foram analisadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular do Hospital das Clínicas, sob responsabilidade da Profa. Dra. Berenice Mendonça.

3.5 Incorporação de BrdU (5'-bromo-2'-dioxiuridina) para a análise das células que sintetizaram DNA – Reação imunohistoquímica por peroxidase

Após 12 h do início do tratamento com o hormônio ACTH (10^{-7} M) e/ou N-POMC^{Cys} ou N-POMC^{Met} ou N-POMC^{Ser} (10^{-7} M ou 10^{-9} M) ou mesmo solução salina (0,9% de cloreto de sódio), todos 100 µl/100 g de p.b., os animais previamente tratados com DEX ou salina foram injetados i.p. com BrdU (5'-bromo-2'-dioxiuridina Sigma, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 100 mg/100 g de peso animal e sacrificados após 12 h (Figura 5). As glândulas retiradas foram fixadas por 8h em formaldeído (Merck, Darmstadt, Alemanha) 10% diluído em água. Após a fixação o material foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Seis cortes (3 µm) por lâmina de cada tratamento foram montados sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas foram desparafinizadas e depois de hidratadas foram colocadas em 0,3% de peróxido de hidrogênio. Em seguida as secções foram hidrolisadas em HCL 1,5 N (30 min) e incubadas com o anticorpo primário anti-BrdU (Amersham GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) “overnight” a 4 °C. Em seguida incubado com o anticorpo secundário biotilado (1:500 em PBS), do kit da Vector (Vectastain ABC mouse IgG Horseradish peroxidase - Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) por 1 h, seguido da incubação por 1 h com o complexo ABC (1:1:1000 em PBS). O material foi revelado através da reação enzimática por peroxidase cujo cromógeno é a diaminobenzidina (DAB-Sigma) Após serem contra-corados com Hematoxilina de Harris, diferenciados com carbonato de lítio saturado e desidratados, as lâminas

foram cobertas por lamínulas usando como meio de montagem o Entellan (Merck). Como controle positivo da reação do anticorpo, utilizamos cortes feitos de uma porção do jejuno retirado de cada animal e submetido ao mesmo protocolo descrito.

Os resultados da variação da incorporação de BrdU foram analisados através da contagem das marcações nucleares nas diferentes zonas que constituem o córtex da suprarrenal. Os núcleos marcados (marrom) e não marcados (azuis) são relativos a uma área de 0,75 mm² analisada com um aumento total de 400x. Foram analisados no total 15 campos por tratamento/zona/animal. Os resultados foram analisados quanto à significância utilizando teste estatístico ANOVA e o contra-teste de Tukey-Kramer do programa Instat (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, EUA).

Figura 5- Protocolo de incorporação de BrdU

Protocolo de incorporação de BrdU para a análise do efeito biológico do ACTH e/ou N-POMC^{Met} ou N-POMC^{Cys} ou N-POMC^{Ser} em induzir a entrada na fase S do ciclo nas células adrenais.

3.6 Processamento das glândulas para obtenção das frações externa e interna da glândula adrenal

Para a análise da expressão gênica e protéica foram obtidas frações das glândulas adrenais através de um procedimento semelhante ao utilizado para obtenção de culturas de células primárias descrito em Mattos e Lotfi (2005).

Os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina e foi feita uma incisão ventral mediana profunda no abdômen, prolongando o corte no sentido do tórax em ambos os lados. O intestino foi rebatido, expondo a região posterior, para que as glândulas suprarrenais pudessem ser retiradas com pinça curva e tesoura. As glândulas foram retiradas e a gordura circundante removida. Após uma pequena incisão na cápsula da glândula com o auxílio de um bisturi, a mesma foi retirada por rolamento, de maneira que obtivemos a cápsula, as células sub-capsulares e as células da zona glomerulosa (ZG). Tanto essa fração, que chamaremos de fração externa (FE) quanto o restante da glândula foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Depois de congelado, o restante da glândula foi dividido ao meio, e com o auxílio de uma lupa e uma mini-cureta, foi retirada parte da medula restando, portanto, as células da zona fasciculada (ZF) e reticulada (ZR), que chamaremos de fração interna da glândula (FI). Essa fração foi de novo rapidamente congelada. Ao final, tínhamos a FE da glândula contendo cápsula+células sub-capsulares + células da ZG e a FI contendo ZF+ZR e resquícios da medula. O material congelado em nitrogênio foi processado para extração de RNA ou para obtenção do lisado protéico, conforme os procedimentos descritos abaixo.

A comprovação da qualidade das frações das amostras obtidas foi feita através de "Immunoblotting" utilizando anticorpos primários específicos para enzimas esteróidogênicas e para tirosina hidroxilase, conforme descrito nos itens 4.5 e 4.6.

3.7 Preparação do lisado protéico das frações das glândulas adrenais

As frações congeladas obtidas, frações internas (FI) e externas (FE) foram homogeneizadas e lisadas em um tampão de lise RIPA contendo 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1% deoxicolato de sódio, 1% NP40, 150mM NaCl, 0,1% de SDS, aprotinina 1

mg/ml, PMSF 1 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml, pepstatina 1mg/ml, água Milli-Q. As amostras foram aliquotadas e estocadas em freezer a -80°C . A quantificação da proteína total foi realizada com 5 μl do lisado mais 995 μl de solução de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) diluído (1:4 em água) analisada em espectrofotômetro (UVmini 1240, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 595 nm. Como padrão de calibração do aparelho e das amostras foi utilizada uma curva de concentrações definidas de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA).

As amostras quantificadas de proteínas (30 μg ao total) foram misturadas a uma solução de tampão de amostra (Tris-HCl pH6,8, glicerol, SDS, β -mercaptoetanol e azul de bromofenol) e desnaturadas a 100°C por 5 minutos antes de serem aplicadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Foi utilizado um padrão de peso molecular para a identificação das bandas (Fermentas Gmbh, Opelstrasse, St. Leon-Rot, Alemanha). Após a separação no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amershan Hybond-ECL GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) utilizando um sistema de transferência Semi-Dry (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) por 60 min a 20V com tampão de transferência pH 8,3 (Tris base, SDS, glicina e 20% de metanol). As membranas foram coradas com uma solução de Ponceau (Merck, Darmstadt, Alemanha) para avaliar a eficiência da transferência e, em seguida, lavadas com água milli-Q.

3.8 "Immunoblotting"

As membranas contendo a proteína total das amostras obtidas tiveram os sítios inespecíficos bloqueados "overnight" (ciclina D1, D3, E e p27) na câmara fria (4°C) ou 2 h 30 min em temperatura ambiente (ciclina D2), em leite desnatado (5%) dissolvido em TBST (Solução de tampão de Tris-HCl pH7,4, NaCl e Tween 20 1% Tween). As membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos primários anti-ciclina D1, D2, D3, E e anti-p27 (1:1000 ou 1:3000) Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) ou Cell Signaling (Cell Signaling Inc., Danvers, MA, EUA) por 2 h 30 min ou "overnight" em câmara fria. Os anticorpos anti- β -actina ou α -actinina (Santa Cruz) 1:2000 ou 1:1000; foram utilizados como controle. A comprovação da qualidade das frações das amostras obtidas foi feita utilizando-se

anticorpos primários específicos para enzimas esteróidogênicas: Citocromo P450 Aldosterona sintase (Cyp11b2) e 11 β hidroxilase (Cyp11b1) ambos da Chemicon (Chemicon, Temecula, CA EUA) e para a enzima Tirosina Hidroxilase (ImmunoStar, Hudson, WI, EUA) presente nas células medulares.

Por último, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo Amershan (Amershan, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. O anticorpo secundário é um conjugado com IgG com peroxidase-streptavidina ("HRP labelled streptavidin bridge system"). Para a revelação usa-se o kit ECL-Plus (Amershan) como substrato que utiliza o luminol, que depois de degradado pela enzima do anticorpo secundário emite luz e impressiona uma chapa de raios X T-MAT G/RA (Carestream Health Inc., Rochester, NY, EUA). Os filmes foram revelados, fixados (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA), lavados e secos. As bandas das chapas foram analisadas utilizando um sistema de captura de imagem Gene Snap 6.05 (SynGene-Synoptic Ltd, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) e quantificadas pelo programa Gene Tools 3.06 (SynGene). Os resultados foram apresentados em forma de gráficos de pelo menos 3 grupos independentes de animais por tratamento utilizado.

3.9 Protocolo de imunoprecipitação para a detecção de ciclina E1

Para detectar a expressão de ciclina E1, os lisados protéicos (500 μ g de proteína total) obtidos das amostras das FI e FE de adrenais de animais tratados por 6 horas foram pré-clareados através de incubação com 20 μ l (0,5 ml agaros / 2,0 ml) de proteína A-Agarose (Santa Cruz) por 1 h a 4 °C. Depois de centrifugado (14.000 g por 10 min), o sobrenadante foi incubado com o 0,4 μ g de anticorpo anti ciclina E (Santa Cruz) "overnight" a 4 °C. As amostras foram novamente incubadas com proteína A-Agarose (4 h a 4 °C), centrifugadas e o "pellet" formado lavado quatro vezes com tampão RIPA. As amostras foram misturadas com 40 μ l de tampão de amostra (Tris-HCl pH6,8, glicerol, SDS, β -mercaptoetanol e azul de bromofenol), em seguida desnaturadas para a dissociação do complexo proteína A-Agarose/anticorpo/ciclina E. Depois de centrifugadas o sobrenadante que contém a proteína de interesse foi aplicado em gel de poliacrilamida 12% para a análise por

“immunoblotting”, conforme descrito anteriormente.

3.10 Tratamentos com ACTH e/ou N-POMCs

Após 28 horas do tratamento com DEX ou solução salina, os animais foram injetados i.p. com ACTH (10^{-7} M) e/ou N-POMC^{Met} ou N-POMC^{Cys} (10^{-7} M) ou ainda solução salina, todos com o volume de 100 μ l / 100 g peso, e sacrificados após 2, 4, 6, 8, 10 ou 12 h (Figura 5). Para a detecção da expressão das ciclinas, as adrenais foram removidas e as proteínas totais extraídas conforme descrito anteriormente. Para a imunolocalização da expressão das ciclinas D3 e E1 e PCNA no córtex adrenal, as glândulas foram retiradas e submetidas ao protocolo descrito na seção 3.10. A extração do RNA total também foi realizada seguindo o mesmo protocolo de tratamento adotado (Figura 6).

Figura 6- Protocolo de tratamento com Dexametasona (DEX), ACTH e/ou N-POMC

Protocolo de tratamento com Dexametasona (DEX), ACTH e/ou N-POMCs para os experimentos de análise de expressão protéica por "immunoblotting", imunoistoquímica e extração de RNA para análise por PCR (reação em cadeia da polimerase).

3.11 Protocolo de imunoistoquímica

As glândulas suprarrenais foram extraídas e o excesso de gordura perirrenal removido. O material foi fixado em formaldeído 4% (para-formoldeído - Merck) diluído em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4) por 12 h. As glândulas foram lavadas para retirar o excesso de fixador, desidratadas através de uma série alcoólica, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Após inclusão, o material foi seccionado em micrótomo (5 μ m) e montado sobre lâminas previamente silanizadas. Os cortes nas lâminas foram desparafinizados em estufa e série de xilol, hidratados com PBS (Solução salina tamponada com fosfato 0,05 M pH 7,4) e colocados por 10 min em solução 0,3% de peróxido de hidrogênio. Para a imunofluorescência, não foi realizada a etapa de bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagem com PBSA, foi feita a recuperação antigênica utilizando solução de ácido cítrico (2 g / l) fervente por 10 min. Os cortes foram incubados por 10 min em temperatura ambiente com uma solução bloqueadora ("Background Blocker Solution" Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, EUA). Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas e incubadas "overnight" a 4 ° C com os anticorpos primários anti-ciclina D3 1:100, anti-ciclina E1 1:100, anti-P27^{Kip1} 1:200 (todos Santa Cruz) ou anti-PCNA 1:500 (Abcam Inc., MA, EUA) diluídos em PBS e 2% de albumina sérica bovina (BSA).

Para a imunofluorescência, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários 1:100 Burro anti-coelho Dylight 594 (ab96921) (Abcam) e 1:50 Cabra anti-camundongo Alexa Fluor 488 (A11029) (Molecular Probes - Life technologies, EUA). Os cortes foram incubados com DAPI (Sigma) e as lamínulas colocados utilizando glicerol/PBS, como meio de montagem. Os cortes foram analisados em um microscópio Multi-fóton Zeiss LSM 780-NLO (Carl Zeiss, Alemanha). Os cortes incubados sem os anticorpos primários testaram negativo para a imunofluorescência.

Para a imunoistoquímica por peroxidase, depois de lavado, o material foi incubado com o anticorpo secundário biotilado (1:1000) e o complexo ABC, ambos kit Vector (Vectastain ABC rabbit IgG Horseradish peroxidase - Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) A revelação ocorreu através da reação enzimática por peroxidase cujo substrato é a diaminobenzidina (DAB-Sigma). Os cortes foram, então, lavados com água destilada, contra-corados com Hematoxilina de Harris e diferenciados com carbonato de lítio saturado, sendo, novamente, lavados com água

destilada, desidratados em série alcoólica, xilol-álcool e xilol. As lamínulas foram colocadas utilizando como meio de montagem o Entellan (Merck).

3.12 Protocolo para a extração do RNA total das frações das glândulas adrenais

A extração do RNA total das frações obtidas das adrenais de animais tratados foi realizada utilizando TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguido de fenol/clorofórmio e precipitação com etanol, conforme as instruções do fabricante. As leituras e quantificações do RNA, DNA e proteínas nas amostras foram feitas em espectrofotômetro (UVmini 1240, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e um programa acoplado (DNA&PROTEIN PROGRAM PACK for UVmini-1240 – Shimadzu). A integridade do RNA total foi analisada após eletroforese em gel de Agarose 1%, e a captura das imagens das bandas correspondentes à fração 18S e 28S dos rRNAs foi obtida através dos programas Gel-Pro Imager e Analyzer 3.1. Foram utilizados até 3 grupos após 6 h de tratamento, 1 grupo após 4 h e 2 grupos após 2 h de tratamento.

3.13 Protocolo para o PCR em tempo real e análise dos dados

A síntese do cDNA foi feita utilizando-se o kit fornecido pelo fabricante das placas de "PCR array" (Sabiosciences - Qiagen, Germantown, MD, EUA). Foram utilizados 1 µg de RNA total das amostras para a preparação do cDNA. Esse foi adicionado ao reagente SYBR Green MIX, fornecido pelo fabricante, e aplicadas nas placas (25 µl por poço). As placas foram lidas (um ciclo de 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C) em um aparelho de PCR tempo real (ABI 7300 ou 7500 - Applied Biosystems - Life Technologies, Carlsbad, CA EUA) no Laboratório de Imunobiologia de Transplantes sob responsabilidade do Prof. Niels Olsen do Departamento de Imunologia do ICB-USP ou no Laboratório de Reparo de DNA sob responsabilidade do Prof. Carlos F. Menck do Departamento de Microbiologia do ICB-USP. Os resultados das amplificações foram analisados automaticamente pelo programa do PCR para a determinação do limite mínimo de

detecção de amplificação das reações, conforme instruções do fabricante. Os dados foram inseridos e analisados através do método da determinação da variação do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e posteriormente analisados quanto à variação da expressão de cada gene, em termos de vezes em relação ao controle. Foram consideradas relevantes somente as variações de transcrições gênicas alteradas em três vezes ou mais em relação ao controle. Os genes “housekeeping” para Beta actina, Proteína ribossomal P1, Lactato desidrogenase, Proteína ribossomal L13A e Fosforibosil transferase, foram utilizados para comparação.

Os dados foram analisados através de um programa disponibilizado “online” em <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>. A lista dos 96 genes analisados é mostrada no Quadro 1. Nós dividimos os genes em 7 grupos de acordo com o papel funcional dele na regulação do ciclo celular.

3.14 Análises estatísticas

Os resultados do efeito biológico e das expressões proteica e gênica foram representativos de 3 experimentos independentes ou mais. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. A significância foi determinada usando o teste de análise de variância (ANOVA) seguido de comparação múltipla de Tukey-Kramer. A significância para os resultados da dosagem de ACTH foi determinada usando o teste T não pareado.

Quadro 1- Lista das siglas e descrições dos genes analisados nas placas de PCR Array. Os genes foram agrupados em 7 categorias de acordo com o papel funcional previsto no ciclo celular (continua)

Fase G1 e transição G1/S	
<i>Camk2a</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
<i>Camk2b</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta
<i>Gpr132</i>	G protein-coupled receptor 132
<i>Itgb1</i>	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
<i>LOC307231</i>	Similar to nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
<i>Nanos2</i>	Nanos homolog 2 (Drosophila)
<i>Slfn1</i>	Schlafen 1
<i>Ppp3ca</i>	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform
<i>Skp2</i>	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
<i>Taf10</i>	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
Fase S e replicação do DNA	
<i>Dnajc2</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2
<i>LOC367976</i>	Similar to DNA replication licensing factor MCM3 (DNA polymerase alpha holoenzyme-associated protein P1) (P1-MCM3)
<i>Mcm2</i>	Minichromosome maintenance complex component 2
<i>Mcm4</i>	Minichromosome maintenance complex component 4
<i>Mki67</i>	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
<i>Mre11a</i>	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)
<i>Msh2</i>	MutS homolog 2 (E. coli)
<i>Pcna</i>	Proliferating cell nuclear antigen
<i>Rad17</i>	RAD17 homolog (S. pombe)
<i>Rad51</i>	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)
<i>Sumo1</i>	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (S. cerevisiae)
Fase G2 e transição G2/M	
<i>Chk1</i>	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
<i>Dnajc2</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2
Fase M	
<i>Brca2</i>	Breast cancer 2
<i>Ccna1</i>	Cyclin A1
<i>Ccnb1</i>	Cyclin B1
<i>Cdc25a</i>	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)
<i>Cdc25b</i>	Cell division cycle 25 homolog B (S. pombe)
<i>Cdk2</i>	Cyclin dependent kinase 2
<i>LOC289740</i>	Similar to PES1 protein
<i>Rad21</i>	RAD21 homolog (S. pombe)

Quadro 1- Lista das siglas e descrições dos genes analisados nas placas de PCR Array. Os genes foram agrupados em 7 categorias de acordo com o papel funcional previsto no ciclo celular (continuação)

<i>Sfn</i>	Stratifin
<i>Smc1a</i>	Structural maintenance of chromosomes 1A
<i>Tsg101</i>	Tumor susceptibility gene 101
Regulação positiva do ciclo celular	
<i>Abl1</i>	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase
<i>Bcl2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2
<i>Brca2</i>	Breast cancer 2
<i>Ccna1</i>	Cyclin A1
<i>Ccna2</i>	Cyclin A2
<i>Ccnb1</i>	Cyclin B1
<i>Ccnb2</i>	Cyclin B2
<i>Ccnc</i>	Cyclin C
<i>Ccnd1</i>	Cyclin D1
<i>Ccnd2</i>	Cyclin D2
<i>Ccne1</i>	Cyclin E1
<i>Ccnf</i>	Cyclin F
<i>Cdk4</i>	Cyclin-dependent kinase 4
<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
<i>E2f1</i>	E2F transcription factor 1
<i>E2f4</i>	E2F transcription factor 4
<i>Gadd45a</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
<i>Itgb1</i>	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
<i>E2f3</i>	E2F transcription factor 3
<i>Rad9</i>	RAD9 homolog (S. pombe)
<i>Ran</i>	RAN, member RAS oncogene family
<i>Skp2</i>	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
<i>Sfn</i>	Stratifin
<i>Shc1</i>	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
<i>Tfdp2</i>	Transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)
<i>Psmg2</i>	Proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 2
Regulação negativa do ciclo celular	
<i>Abl1</i>	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase
<i>Atm</i>	Ataxia telangiectasia mutated homolog (human)
<i>Brca1</i>	Breast cancer 1
<i>Casp3</i>	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease

Quadro 1- Lista das siglas e descrições dos genes analisados nas placas de PCR Array. Os genes foram agrupados em 7 categorias de acordo com o papel funcional previsto no ciclo celular (conclusão)

<i>Cdkn2a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<i>Inha</i>	Inhibin alpha
<i>Rbl1</i>	Retinoblastoma-like 1 (p107)
<i>Rbl2</i>	Retinoblastoma-like 2
<i>Tp53</i>	Tumor protein p53
<i>Tp73l</i>	Tumor protein p73-like
Controles "housekeeping" e positivos de reação	
<i>Rplp1</i>	Ribosomal protein, large, P1
<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
<i>Rpl13a</i>	Ribosomal protein L13A
<i>Ldha</i>	Lactate dehydrogenase A
<i>Actb</i>	Actin, beta
<i>RGDC</i>	Rat Genomic DNA Contamination
<i>RTC</i>	Reverse Transcription Control
<i>RTC</i>	Reverse Transcription Control
<i>RTC</i>	Reverse Transcription Control
<i>PPC</i>	Positive PCR Control
<i>PPC</i>	Positive PCR Control
<i>PPC</i>	Positive PCR Control

4 RESULTADOS

4.1 Resultados da eficiência do tratamento com a DEX para a depleção do ACTH circulante

Foram utilizadas três diferentes concentrações de DEX (10, 50 e 100 µg/100 g de peso do animal) para inibir a liberação de ACTH e N-POMC plasmáticos. Observamos que as três concentrações utilizadas diminuíram significativamente o ACTH plasmático (Figura 7a). No entanto, segundo a literatura a faixa entre 50-100 µg/100g do peso do animal é a mais utilizada (KANT et al., 1989; THOMAS, et al., 2004; ULRICH-LAI, et al., 2006). Portanto, optamos pela menor concentração dessa faixa, que foi de 50µg/100g do peso do animal. Os resultados mostrados na figura 7b revelaram que, o tratamento com DEX após 24 h, resultou em uma redução significativa de 44% nos níveis de ACTH circulante. Esse resultado sugere que a DEX atua na depleção do ACTH plasmático nas primeiras 24 h, perdendo este efeito após 8 h, isto é, após 32 h o eixo HPA não está mais bloqueado. Sendo assim, a janela temporal para iniciarmos os tratamentos com os peptídeos de interesse, deveria ocorrer entre 24 e 32 h. Logo, determinamos que após 28 h do tratamento com a DEX a concentração do ACTH circulante seria a menor possível com o menor efeito direto da DEX.

Figura 7- Estabelecimento da concentração Dexametasona e do tempo de tratamento dos peptídeos

Análise da concentração de ACTH plasmático de animais tratados **a)** com diferentes concentrações de Dexametasona - DEX (10, 50 e 100 µg / 100 g peso do animal) por dois dias ou salina (controle); **b)** com DEX (50 µg / 100 g) após 24, 32 e 48 horas da última injeção. n=5-9 *p<0,05.

4.2 Detecção do ACTH plasmático após injeção i.p.

Com a finalidade de estimar por similaridade os níveis de N-POMC presentes no plasma após uma injeção intraperitoneal i.p., foi analisada a concentração de ACTH no plasma dos animais tratados com ACTH 10^{-7} M (100 µl / 100 g de peso do animal). A estimativa foi similar porque não existe, comercialmente, uma análise

quantitativa para a detecção específica dos peptídeos N-terminais da POMC circulantes.

Foi calculado a partir dos resultado em pg/mL a concentração do ACTH em M (valores entre parênteses). Observamos que após 15 minutos da injeção de ACTH sua concentração no plasma foi de $240,0 \pm 86.1$ pg / mL ($5,3 \times 10^{-11}$ M), que se reduziu para $168,2 \pm 39,5$ pg / mL ($3,7 \times 10^{-11}$ M) e $43,2 \pm 15.1$ pg / mL ($0,95 \times 10^{-11}$ M), após 30 min e 2 h, respectivamente (Figura 8).

Figura 8- Análise quantitativa do ACTH plasmático

Concentração de ACTH plasmático em animais tratados por 2 dias com DEX ($50 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$ de peso) e uma única injeção (i.p.) de ACTH (10^{-7} M), após 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. n=3.

4.3 Análise da incorporação de BrdU em animais tratados com Dex e peptídeos derivados da POMC

Na figura 9 podemos observar que o tratamento com DEX não promoveu alterações significativas no número de núcleos que incorporaram BrdU nas ZG e ZF. Porém, na ZR, a administração de DEX promoveu uma redução total das células em fase S do ciclo celular (Figura 10a).

O tratamento com ACTH (10^{-7} M) induziu um aumento estatisticamente significativo no número de células que entraram na fase S do ciclo celular em todo o

córtex (9,96% ZG; 24,13% ZF; 39,86% ZR). Além disso, na ZR, foi mais eficaz do que o efeito proliferativo desencadeado pelos peptídeos N-POMC (40 % versus N-POMC^{Cys} 12% e N-POMC^{Met} 21%), como mostrado nas figuras 9 e 10b.

A administração de 10^{-7} M de N-POMC^{Cys} aumentou significativamente a porcentagem de núcleos positivos para BrdU nas ZG e ZR (15% e 12%, respectivamente) enquanto que na ZF não observamos nenhuma alteração significativa. No entanto, o tratamento com N-POMC^{Met} na mesma concentração promoveu um aumento significativo no número de células que incorporaram BrdU em todas as zonas: ZG (8,4%), ZF (17,1%) e na ZR (21,4%). Esse efeito não foi observado após a administração de uma concentração menor, 10^{-9} M, do peptídeo N-POMC^{Met} em nenhuma das zonas analisadas (Figuras 9 e 10c/d).

O tratamento conjunto com ACTH e N-POMC^{Met} 10^{-7} M (Figuras 9 e 10e) induziu um aumento no número de núcleos marcados nas três zonas do córtex (21,3% ZG; 12,0% ZF; 12,8% ZR), quando comparado com o controle. Ao compararmos o efeito dos peptídeos combinados com os tratamentos isolados de ACTH ou N-POMC^{Met} observamos que na ZG houve um aumento de 12,5% de núcleos marcados em relação aos tratamentos isolados, enquanto na ZR houve uma diminuição de 17,7% na incorporação de BrdU. O mesmo não ocorreu na ZF, pois não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento conjunto e os tratamentos isolados. No entanto, o tratamento ACTH + N-POMC^{Cys} (Figuras 8 e 9f) resultou em um aumento significativo de 20% em núcleos BrdU-positivos na ZG, nenhum efeito na ZF ($p < 0,07$) e uma diminuição estatisticamente significativa de 23% na ZR em relação ao tratamento com ACTH isolado.

A administração de N-POMC^{Ser} não promoveu alterações estatisticamente significantes no número de células que incorporaram BrdU, em relação ao controle DEX, independente da zona analisada (Figuras 9 e 10g).

Figura 9- Análise do efeito proliferativo dos peptídeos derivados da POMC por incorporação de BrdU – Entrada na fase S do ciclo celular

Porcentagem de núcleos positivos para BrdU nas diferentes zonas do córtex de adrenal de ratos tratados por 2 dias com DEX (50 µg / 100 g de peso) e N-POMC₁₋₂₈ (NP) com (N-POMC^{Cys}) ou sem (N-POMC^{Met} ou N-POMC^{Ser}) pontes dissulfeto. Concentrações utilizadas: ACTH, N-POMC^{cys} e N-POMC^{ser} = 10⁻⁷ M; N-POMC^{met} = 10⁻⁷ ou 10⁻⁹ M. (+) DEX versus salina, (*) tratamentos versus DEX, (#) ACTH+N-POMC versus ACTH. * # + p<0,05. n=3-5.

Figura 10- Incorporação de BrdU no córtex adrenal

Fotomicrografias representativas da distribuição de células BrdU-positivas no córtex adrenal de animais tratados por 2 dias com **a)** DEX (50 µg / 100 g de peso) **b)** ACTH (10^{-7} M); **c)** N-POMC^{Met} (10^{-7} M); **d)** N-POMC^{Cys} (10^{-7} M); **e)** ACTH+N-POMC^{Met}; **f)** ACTH+N-POMC^{Met}; **g)** N-POMC^{Ser} (10^{-7} M) Barra: 100µm. ZG: Zona Glomerulosa; ZF: Zona Fasciculada; ZR: Zona Reticulada.

4.4 Caracterização da fração interna (FI) e da fração externa (FE) da glândula

Com a intenção de qualificar e quantificar as frações, interna (FI) e externa (FE), obtidas a partir da dissecação do córtex de glândulas adrenais de rato, com a retirada da medula, analisamos a expressão das enzimas Citocromo P450 Aldosterona sintase (Cyp11b2), a Citocromo P450 11 β hidroxilase (Cyp11b1), e a enzima Tirosina Hidroxilase (TH) (Figura 10). Como o esperado, a FI não expressa Cyp11b2 (Figura 11a), enquanto a FE apresenta uma expressão de Cyp11b1 menor que duas vezes aquela expressa na FI, com ou sem medula (Figura 11b). A retirada da medula reduz em 40% a expressão da enzima TH. Esses resultados mostram uma separação eficiente das frações interna e externa do córtex adrenal.

Figura 11- Caracterização das frações obtidas pela dissecação das glândulas adrenais de rato

Detecção da expressão de enzimas esteróidogênicas específicas das frações interna (FI) e externa (FE) das suprarrenais obtidas segundo a técnica descrita em material e métodos. **a-** Citocromo P450 aldosterona sintase (Cyp11b2); **b-** Citocromo P450 11β hidroxilase (Cyp11b1); **c-** Tirosina Hidroxilase (TH). * $p < 0,05$ $n=3$.

4.5 Expressão proteica das ciclinas D e P27^{Kip1} no córtex adrenal

4.5.1 Inibição do eixo HPA através da ação da DEX

A ausência na circulação dos peptídeos derivados da POMC não alterou a expressão da proteína ciclina D1 no córtex adrenal (Figura 12 a1, b1 e c1). Entretanto, a expressão da ciclina D2 foi reduzida significativamente (0,7 vezes) na FI, 34 h após a administração de DEX e manteve-se reprimida decorridas 36 h (0,8 vezes), conforme mostra a figura 12 a2, b2 e c2.

A inibição do eixo HPA também promoveu uma redução significativa de 0,7 vezes na expressão de ciclina D3 em todo o córtex adrenal após 34 h. Após 36 h a

diminuição apresentada foi de 0,3 vezes na FI e se manteve em 0,7 vezes na FE (Figura 13 a1, b1 e c1).

Por outro lado, foi observado um aumento significativo de 2,2 vezes na expressão de P27^{Kip1} na FI após 32 h, quando comparado ao animal controle tratado com salina. Entretanto, transcorridas 34 h do tratamento com DEX observamos na FI uma redução significativa (0,7 vezes) nos níveis de expressão de P27^{Kip1}. Passadas 36 h não houve modulação desta proteína na FI, e na FE ocorreu uma diminuição significativa (0,4 vezes) na expressão de P27^{Kip1} (Figura 13 a2, b2 e c2).

Figura 12- Expressão das proteínas ciclinas D1 e D2, após inibição do eixo HPA com DEX

Expressão e quantificação obtida por "immunobloting" das proteínas ciclina D1 e ciclina D2 nas frações interna (FI) e externa (FE) do córtex adrenal de ratos tratados com DEX (DEX+) ou salina (DEX-) após 32 h (a), 34 h (b) ou 36 h (c) da segunda injeção. n=3 *p<0,05 ***p<0,01.

Figura 13- Expressão da proteína ciclina D3 e P27^{Kip1} após inibição do eixo HPA com DEX

Expressão e quantificação por "immunoblot" das proteínas ciclina D3 e P27^{Kip1} nas frações interna (FI) e externa (FE) do córtex adrenal de ratos tratados com DEX (DEX+) ou salina (DEX-) após 32 h (a), 34 h (b) ou 36 h (c) da segunda injeção do tratamento. n=3 *p<0,05 ***p<0,01.

4.5.2 Efeitos dos peptídeos derivados da POMC na expressão da proteína ciclina D1

Animais tratados com DEX e posteriormente injetados com ACTH ou peptídeos N-POMC não apresentaram alteração significativa na expressão da ciclina D1 nas frações analisadas em relações aos controles, após 4 horas de tratamento (Figura 14a). Entretanto, decorridas 6 horas observamos que a administração de N-POMC^{Cys} aumentou significativamente (1,6 vezes) a expressão desta proteína na FE (Figura 14b). Após 8 horas a administração conjunta de ACTH+N-POMC^{Met} promoveu diminuição significativa da expressão de ciclina D1 na FI (0,6 vezes) em relação ao controle tratado somente com DEX (Figura 14c).

Figura 14- Expressão da proteína ciclina D1 nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos

Expressão e quantificação por "immunoblot" da proteína ciclina D1 nas frações interna (FI) e externa (FE) obtidas do córtex da suprarrenal de ratos tratados por 2 dias com (50 µg / 100 g p.b.) DEX (DEX+) e tratados por 4 h (a), 6 h (b) ou 8 h (c) com ACTH (10^{-7} M) e/ou N-POMC^{Met} (10^{-7} M) ou N-POMC^{Cys} (10^{-7} M). n= 3-5. *p<0,05.

4.5.3 Efeitos dos peptídeos derivados da POMC na expressão de ciclina D2

Transcorridas 4 horas da administração dos peptídeos derivados da POMC, observamos que somente tratamentos conjuntos ACTH e N-POMC^{Met} (A+P^{Met}) aumentaram em aproximadamente três vezes a expressão de ciclina D2 na FI (Figura 15a). Entretanto, passadas 6 horas somente o tratamento com N-POMC^{Cys} aumentou significativamente (3 vezes) a expressão de ciclina D2 na FE (Figura 15b). Decorridas 8 horas, constatamos que este aumento persiste na FE (2 vezes). Além disso, frações adrenais de animais tratados com N-POMC^{Met} apresentaram um pequeno aumento apesar de insignificante de 0,05 vezes da ciclina D2 na FI, e uma diminuição de 0,1 vezes dessa proteína na FE, comparado com animais tratados somente com DEX (Figura 15c).

Figura 15- Análise da expressão da proteína ciclina D2 nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos

Expressão e quantificação por "immunoblot" da proteína ciclina D2 nas frações interna (FI) e externa (FE) obtidas do córtex da suprarrenal de ratos tratados por 2 dias com (50 µg / 100 g p.b.) DEX (DEX+) e tratados por 4 h (a), 6 h (b) ou 8 h (c) com ACTH (10^{-7} M) e/ou N-POMC^{Met} (10^{-7} M) ou N-POMC^{Cys} (10^{-7} M). n= 3-5. *p<0,05; ***p<0,001.

4.5.4 Efeitos dos peptídeos derivados da POMC na expressão de ciclina D3

Quatro horas após a administração de ACTH ou peptídeos sintéticos, N-POMC^{Met} ou N-POMC^{Cys}, foi observada na FI um aumento na expressão de ciclina D3 de, respectivamente, 1,5 vezes, 1,5 vezes e 1,8 vezes, em relação ao controle (Figura 16a). Além disso, a expressão foi mantida elevada 6 horas após administração de ACTH ou N-POMC^{Met} (1,4 vezes e 1,5 vezes, respectivamente) ou ainda aumentada (3,5 vezes) após tratamento com N-POMC^{Cys} (Figura 16b). Passadas 8 horas, apenas a administração de N-POMC^{Met} isolado ou em combinação com ACTH resultou em um aumento significativo (2,3 vezes e 2,4 vezes, respectivamente) da expressão de ciclina D3 na FI (Figura 16c). Em contraste com o observado na FI, na FE a expressão de ciclina D3 não foi alterada, independentemente do tratamento e do tempo analisado, com exceção do tratamento conjunto ACTH e N-POMC^{Met}, que diminuiu a expressão de D3 em 0,5 vezes, após 6 h de tratamento.

Com o intuito de observar o envolvimento da ciclina D3 na estimulação pró-mitótica do ACTH e o peptídeo N-POMC^{Cys}, analisamos a expressão de ciclina D3 e da proteína PCNA através de imunoistoquímica por fluorescência. Nossos resultados mostraram que o tratamento com DEX reduziu o número de células positivas para ciclina D3 e PCNA em todo o córtex (Figura 17a-b). O tratamento com ACTH restaurou a expressão de ciclina D3 e PCNA principalmente na ZR e na porção mais interna da ZF (Figura 17c). Por outro lado, a administração de N-POMC^{Cys} aumentou a expressão tanto de ciclina D3 quanto PCNA na ZG e na porção mais externa da ZF (Figura 17d).

Figura 16- Análise da expressão da proteína ciclina D3 nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos

Expressão e quantificação por "immunoblot" da proteína ciclina D3 nas frações interna (FI) e externa (FE) obtidas do córtex da suprarrenal de ratos tratados por 2 dias com (50 µg / 100 g p.b.) DEX (DEX+) e tratados por 4 h (a), 6 h (b) ou 8 h (c) com ACTH (10^{-7} M) e/ou N-POMC^{Met} (10^{-7} M) ou N-POMC^{Cys} (10^{-7} M). n= 3-5. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 17- Imunolocalização das proteínas ciclina D3 e PCNA expressas no córtex de adrenal de rato

Adrenais de animais tratados por 2 dias com salina (**a**) ou (50 μg / 100 g p.b.) DEX, e tratados por 6 horas com: salina (**b**); ACTH (10^{-7} M) (**c**); N-POMC^{Cys} (10^{-7} M). PCNA-positivo: verde. Ciclina D3-positivo: vermelho. PCNA+Ciclina D3: amarelo. Barra 100 μm . Linha branca: limite entre o córtex e a capsula (C). ZG: Zona glomerulosa; ZF: Zona Fasciculada; ZR: Zona Reticulada.

4.5.5 Efeitos dos peptídeos derivados da POMC na expressão $P27^{Kip1}$

Transcorridas 4 horas das injeções de ACTH, N-POMC^{Met}, N-POMC^{Cys} ou ACTH+N-POMC^{Met} foi observado um aumento de expressão de $P27^{Kip1}$ na FI (2,2 vezes, 1,9 vezes, 1,4 vezes e 1,7 vezes, respectivamente) em relação ao controle. Por outro lado, a administração de N-POMC^{Cys} diminuiu a expressão dessa proteína em 0,5 vezes na ZG (Figura 18a).

Após 6 horas da administração de N-POMC^{Met} e de ACTH+N-POMC^{Met} ocorreu uma diminuição, respectivamente, de 0,5 vezes e 0,4 vezes na expressão de $P27^{Kip1}$ na FI, enquanto que a administração com N-POMC^{Cys} manteve o mesmo nível de expressão (1,4 vezes maior em relação ao controle). Entretanto, na FE todos os tratamentos após 6 horas induziram redução na expressão de $P27^{Kip1}$ (Figura 18b): ACTH 0,8 vezes; N-POMC^{Met} 0,4 vezes; ACTH+N-POMC^{Met} 0,6 vezes; N-POMC^{Cys} 0,8 vezes.

A regulação negativa na expressão de $P27^{Kip1}$ foi revertida na FI após 8 horas de tratamento com ACTH e N-POMC^{Cys}, atingindo os níveis do controle. Entretanto, houve um aumento significativo da sua expressão em relação ao controle no mesmo período de tempo, após injeção com N-POMC^{Met} (2,15 vezes) e ACTH+N-POMC^{Met} (2 vezes), como mostrado na figura 18c. Na FE observamos que, decorridas 8 horas, os tratamentos com ACTH, N-POMC^{Met} e ACTH+N-POMC^{Met} continuaram reprimindo $P27^{Kip1}$ (0,8 vezes, 0,7 vezes e 0,6 vezes respectivamente).

A análise por imunoistoquímica mostrou que a expressão de $P27^{Kip1}$ foi aumentada em todo o córtex adrenal após a inibição do eixo HPA (Figura 19a-b), enquanto que o tratamento com ACTH diminuiu sua expressão, revertendo-a aos níveis do controle (Figura 19c). As administrações com os peptídeos N-POMC diminuíram a marcação para $P27^{Kip1}$ principalmente na ZF (Figura 19d).

Figura 18- Análise da expressão da proteína P27^{Kip1} nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos

Expressão e quantificação por "imunoblot" da proteína P27^{Kip1} nas frações interna (FI) e externa (FE) obtidas do córtex da suprarrenal de ratos tratados por 2 dias com (50 µg / 100g p.b.) DEX (DEX+) e tratados por 4 h (a), 6 h (b) ou 8 h (c) com ACTH (10⁻⁷M) e/ou N-POMC^{Met}(10⁻⁷M) ou N-POMC^{Cys}(10⁻⁷M). n= 3-5. *p<0,05.

Figura 19- Imunolocalização da expressão da proteína P27^{Kip1} no córtex adrenal de rato

Imunolocalização da expressão de P27^{Kip1} no córtex de adrenais de animais tratados por 2 dias com salina (a) ou DEX (50 µg / 100 g p.b.) e tratados por 6 horas com: salina (b); ACTH (10⁻⁷ M) (c); N-POMC^{Met} (d); N-POMC^{Cys} (e). As células positivas para P27^{Kip1} estão marcadas em marrom. Os cortes foram contra corados com hematoxilina e diferenciados com carbonato de lítio. Barra 50 µm. Capsula (C); ZG: Zona glomerulosa; ZF: Zona Fasciculada.

4.6 Expressão proteica da ciclina E1 no córtex adrenal

A inibição da produção e secreção de peptídeos derivados da POMC em animais tratados com DEX resultou em uma diminuição significativa (0,3 vezes) na expressão de ciclina E na FE da adrenal, quando comparados com o controle, conforme observado na Figura 20a. Os animais tratados com ACTH, N-POMC^{Met} e tratamento conjunto, após 6 h, promoveram um aumento na expressão de ciclina E1 na FE, de respectivamente, 4, 2,6 e 2,6 vezes, quando comparados com o controle. Por outro lado, na FI não foi observada nenhuma modulação desta proteína, independente do tratamento utilizado (Figura 20b).

Os resultados dos experimentos de imunoistoquímica mostraram que a expressão de ciclina E1 em animais DEX foi restrita às células das ZR e ZF, e principalmente no citoplasma das células da região mais externa da ZF (Figura 21a). A administração de ACTH, N-POMC^{Met}, N-POMC^{Cys} ou a combinação de ACTH e N-POMC^{Met} ou ACTH e N-POMC^{Cys} (Figura 21b-f) resultou em um aumento no número de células ciclina E1-positivas (núcleo e citoplasma) na ZG. Curiosamente, nas células da ZF houve diminuição de ciclina E citoplasmática.

Figura 20- Análise da expressão da proteína ciclina E1 nas frações obtidas do córtex adrenal de ratos

Análise da expressão e quantificação por "immunoblot" da ciclina E1 (a,b) na fração interna (FI) e externa (FE) obtidas do córtex da suprarrenal de ratos tratados por 2 dias com (50 µg / 100 g p.b.) DEX (DEX+) e tratados por 6 horas com ACTH (10^{-7} M) e/ou N-POMC^{Met} (10^{-7} M) ou ainda tratados somente com salina (DEX-). n= 3. *p<0,01.

Figura 21- Imunolocalização da expressão de ciclina E1

Imunolocalização da expressão de ciclina E1 no córtex de adrenais de animias tratados por 2 dias com (50µg/100g p.b.) Dex e tratados por 6 horas com: salina (a); ACTH (10^{-7} M) (b); N-POMC^{Met} (c); ACTH+ N-POMC^{Met} (d); N-POMC^{Cys} (e); ACTH+N-POMC^{Cys} (f). As células positivas para ciclina E estão marcadas em marrom. Os cortes foram contra corados com hematoxilina. Barras 100 µm e 50 µm (insertos).

4.7 Análise da expressão gênica dos genes relacionados com o ciclo celular

4.7.1 Expressão gênica após inibição do eixo HPA

A análise dos resultados obtidos do PCR quantitativo em tempo real mostrou que a falta dos peptídeos POMC circulantes promoveu, após 30 horas da injeção de DEX, uma diminuição na expressão dos genes analisados tanto na FI quanto na FE. Especificamente, os genes que foram negativamente regulados na FI foram: o gene de controle de “checkpoint” do ciclo celular e parada do ciclo o gene *Apbb1*, os relacionados com a regulação positiva do ciclo celular, genes *Ccnb2* e *Ccnf*, com a regulação negativa do ciclo celular, gene *Cdkn2a*, e os relacionados com a fase M do ciclo celular, genes *Chek1* e *Nek2*. Na FE a diminuição ocorreu na expressão dos genes relacionados com a regulação positiva do ciclo celular, os genes *Ccna2*, *Ccnb1*, *Ccnb2*, *Ccnf*, *E2f1* e com a fase M, o gene *Nek2* (Figura 22a).

Decorridas 32 horas do tratamento com DEX, observamos que a inibição do eixo HPA promoveu alterações da expressão gênica somente na FE da glândula adrenal. Conforme mostrado na figura 22b, houve um aumento na expressão do gene *Gpr132*, cuja expressão ocorre na fase G1 e transição G1/S, e do gene *Tp63* envolvido na regulação negativa do ciclo. Além disso, observamos uma diminuição na expressão do gene relacionado com a fase M do ciclo celular, o gene *Nek2* e aqueles relacionados com o controle positivo, os genes *Ccna2*, *Ccnb1* e *Ccnb2* e controle negativo, o gene *Brca1*, do ciclo celular, mais os relacionados com a fase S do ciclo, os genes *Rad51* e *LOC367976*.

Passadas 34 horas do tratamento com DEX, constatamos que na FI ocorreu inibição da expressão dos genes *Ccnb2* e *Nek2*, que estão relacionados com a regulação positiva do ciclo e com a fase M do ciclo, bem como um aumento na expressão de *Rbl1* que regula negativamente o ciclo celular. No entanto, na FE foi observado somente a inibição dos genes *Ccnb1*, *Ccnb2*, *Ccnf*, relacionados com regulação positiva do ciclo e os genes *Nek2* e *Cdc25b*, relacionados com a fase M do ciclo celular (Figura 22c).

Figura 22- Expressão gênica do córtex adrenal após inibição do eixo HPA com DEX

Expressão de genes relacionados ao controle do ciclo celular através de qPCR "array". Somente os genes diferencialmente expressos 3 vezes ou mais com significância ($p < 0,05$) foram levados em consideração. As análises foram feitas a partir de frações interna (FI) e externa (FE) de adrenais de animais tratados por 2 dias com DEX (50 μg / 100 g p.b.) decorridas 32 h (a), 34 h (b) e 36 h (c) da última injeção de DEX. Resultados das expressões mostrados em número de vezes em relação ao controle com salina para cada gene. $n=3$.

4.7.2 Efeitos do ACTH na expressão gênica

Animais tratados por duas horas com ACTH apresentaram na FI adrenal uma diminuição na expressão do gene *Tp63* e um aumento na expressão do gene *Nek2*, envolvidos, respectivamente, na regulação negativa do ciclo celular e com a fase M. Na FE não foi observada alteração do padrão de expressão dos genes analisados após esse tempo de tratamento (Figura 20a).

Decorridas 4 horas da administração de ACTH, observamos, preliminarmente, um aumento da expressão do gene *Ccna2*, que está relacionado com o controle positivo do ciclo celular, enquanto na FE ocorreu um aumento na expressão de *LOC307231*, que está presente na transição G1/S e inibição da expressão dos genes *Cdkn1a* e *Dst*, ambos relacionados a parada no ciclo celular, do gene *Dnajc2*, expresso na fase S do ciclo e dos genes *Prm1* e *Terf1*, ambos presentes na fase M do ciclo celular (figura 20b). Transcorridas 6 horas da injeção com ACTH, não foram observadas alterações na expressão dos genes estudados.

Figura 23- Expressão gênica do córtex adrenal após tratamento com ACTH

Expressão de genes relacionados ao controle do ciclo celular através de qPCR "array". Somente os genes diferencialmente expressos 3 vezes ou mais com significância ($p < 0,05$) foram levados em consideração. As análises foram feitas a partir de frações interna (FI) e externa (FE) de adrenais de animais tratados por 2 dias com DEX ($50 \mu\text{g} / 100 \text{ g p.b.}$) seguido por ACTH (10^{-7}M) após 2 h (a) e 4 h (b). Resultados das expressões mostrados em número de vezes em relação ao controle com DEX para cada gene. $n=1-3$.

4.7.3 Efeitos do N-POMC^{Met} na expressão gênica

A administração do peptídeo N-POMC^{Met} resultou, após 2 horas, na diminuição da expressão dos genes *Npm2* e *Cdkn2a*, respectivamente, expresso na fase M e envolvido com a parada do ciclo celular na FE (Figura 24a).

Após 4 horas, o tratamento com N-POMC^{Met} aumentou a expressão do gene regulador positivo do ciclo, o gene *Ccna2* na FI e reprimiu a expressão do gene *Nek2* na FE, relacionado com a fase M do ciclo celular. Entretanto, após 8 horas da injeção com N-POMC^{Met} houve um aumento acentuado da expressão do gene *Cdc25b* na FE, expresso e relacionado com a fase M (Figura 24b, c).

Figura 24- Expressão gênica após tratamento com N-POMC^{Met}

Expressão de genes relacionados ao controle do ciclo celular através de qPCR "array". Somente os genes diferencialmente expressos 3 vezes ou mais com significância ($p < 0,05$) foram levados em consideração. As análises foram feitas a partir de frações interna (FI) e externa (FE) de adrenais de animais tratados por 2 dias com DEX ($50 \mu\text{g} / 100 \text{ g p.b.}$) seguido por N-POMC^{Met} (10^{-7}M) após 2 h (a), 4 h (b) e 6 h (c). Resultados das expressões mostrados em número de vezes em relação ao controle com DEX para cada gene. $n=3$.

4.7.4 Efeitos do N-POMC^{Cys} na expressão gênica

Após duas horas da administração do peptídeo N-POMC^{Cys} não foram observadas alterações significantes na expressão gênica das frações obtidas do córtex adrenal, no entanto após 4 horas observamos uma expressão muito aumentada do gene *Ccna2* na FI, que é um regulador positivo do ciclo celular. Na FE houve aumento na expressão dos genes *Cdkn2a* e *Pkd1*, ambos relacionados com a parada no ciclo e do gene *LOC307231*, expresso na fase M do ciclo celular (Figura 25a).

Decorridas 6 horas do tratamento com N-POMC^{Cys}, observamos que, na FE, houve redução da expressão dos genes *Ccne1*, *E2f1* e *Npm*, relacionados, respectivamente, com a regulação positiva e negativa e com a fase M do ciclo celular (Figura 25b).

Figura 25- Expressão gênica após tratamento com N-POMC^{Cys}

Expressão de genes relacionados ao controle do ciclo celular através de qPCR "array". Somente os genes diferencialmente expressos 3 vezes ou mais com significância ($p < 0,05$) foram levados em consideração. As análises foram feitas a partir de frações interna (FI) e externa (FE) de adrenais de animais tratados por 2 dias com DEX ($50 \mu\text{g} / 100 \text{ g p.b.}$) seguido por N-POMC^{Cys} (10^{-7}M) após 4 h (**a**) e 6 h (**b**). Resultados das expressões mostrados em número de vezes em relação ao controle com DEX para cada gene. $n=3$.

5 DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento do modelo experimental - inibição do eixo HPA

O modelo experimental adotado nesse estudo, que utiliza o tratamento agudo com DEX para inibir a produção e liberação do ACTH e de outros peptídeos derivados da POMC, foi estabelecido anteriormente e tem sido utilizado como rotina (BACCARO et al., 2007; TORRES; MENDONÇA; LOTFI, 2010). A DEX é um glicocorticoide sintético cuja potência de inibição do eixo HPA é 17 vezes maior quando comparado com o cortisol, o glicocorticoide natural (MEIKLE; TAYLER, 1977). A metabolização lenta dos corticosteroides sintéticos, como a DEX, associada a uma alta afinidade por receptores de glicocorticoides (7 vezes maior no caso da DEX em relação ao cortisol) explica, em parte, a elevada potência e a longa duração de ação, comparada com os corticosteroides naturais (MIGEON et al., 1959). Entretanto, não se sabe plenamente como o glicocorticoide inibe a transcrição do gene *Crh* nos neurônios do hipotálamo, responsáveis pela produção deste hormônio. Estudos *in vitro* sugerem que o glicocorticoide reprime elementos de ligação responsivo à monofosfato de adenosina cíclico (CREB), e que esta inibição seria responsável pela diminuição da transcrição de *Crh* (Guardiola-Díaz et al., 1996). Entretanto, a ação dos glicocorticoides na repressão do gene *Pomc* nos corticotrofos já é conhecida e bem descrita. A presença de sequências contendo elementos responsivos aos glicocorticoides (GRE) no promotor do gene *Pomc*, promove a repressão gênica (para revisão, WATTS, 2005).

A presença de receptores de glicocorticoides na adrenal foi descrita tanto em ratos (LOOSE et al., 1980) quanto em humanos (KONTULA et al., 1985), mas o papel destas proteínas na glândula adrenal ainda não é plenamente conhecido. A DEX poderia exercer um efeito direto na supressão da produção dos corticosteroides adrenais, entretanto Loose et al. (1980) sugerem que este efeito é resultante da atrofia do córtex adrenal e não de um suposto efeito direto da DEX.

Nesse trabalho resolvemos otimizar o tempo necessário de ação da DEX no eixo HPA através da quantificação da concentração do ACTH circulante no plasma, após tratamento com DEX. Dessa maneira, foi determinada a janela temporal quando foi observado o menor efeito da DEX e maior inibição da concentração de ACTH circulante. Portanto, foi estabelecido como tempo ideal a média entre o momento em que o ACTH circulante estava inibido ao máximo sob o efeito da DEX

(24 horas) e o momento em que os níveis do ACTH se assemelhavam ao controle (32 horas).

Ainda com o intuito de melhor compreender e estabelecer o modelo experimental em estudo foi determinada a concentração do ACTH plasmático após a injeção intraperitoneal de 10^{-7} M ACTH, uma dose farmacológica. Com essa análise observamos que a concentração de ACTH, no plasma de ratos tratados com 10^{-7} M ACTH, atingiu níveis similares ao do pulso noturno de ACTH, que é de 151 ± 43 pg / ml (USATEGUI et al., 1976), portanto similar à concentração fisiológica.

O ACTH, assim como todos os peptídeos derivados da POMC, é secretado em pulsos controlados pelo ciclo circadiano, pela liberação de CRH e pelos corticosteroides periféricos. Em condições basais aproximadamente 18 a 25 pulsos de ACTH são detectados durante 24 horas (YOUNG; CARLSON; BROWN, 2001). Devido ao fato dos peptídeos produzidos pelas células corticotróficas serem derivados de uma molécula precursora em comum, o ACTH, os peptídeos N-terminal, o JP e a β -LPH são secretados em quantidades equimolares. De fato, já foi descrito que os níveis de peptídeos N-terminal e ACTH no plasma de indivíduos com doença de Cushing, assim como em indivíduos controles normais, variavam de forma similar (CHAN; SEIDAN; CHRÉTIEN, 1983). Portanto, através da quantificação do ACTH inferimos que a concentração dos peptídeos sintéticos N-POMC utilizados foi semelhante ao ACTH e portanto próximo à fisiológica, uma vez que ainda não é possível a quantificação desses peptídeos no plasma. No entanto, essas evidências não descartam a possibilidade de que a meia-vida dos peptídeos sejam diferentes na circulação (BETARGNA et al., 1981).

5.2 Análise da proliferação *in vivo*

Nossos resultados mostraram que a inibição do eixo HPA promovida pela DEX no modelo experimental adotado não foi suficiente para alterar o número de células em fase S a não ser na zona mais interna do córtex adrenal, mais especificamente na ZR. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Ceccatelli et al. (1995), Davis et al. (2000), Tchen et al. (1977) e Torres e Lotfi (2007) em modelos de hipofisectomia ou de tratamentos com DEX, que mostraram que somente na porção mais interna do córtex ocorre a atrofia da glândula. A depressão

do eixo HPA por um tratamento crônico com DEX promove uma diminuição tanto na transcrição dos genes *Crh* e *Pomc* quanto na secreção dos peptídeos já processados e derivados da POMC. A relação entre a administração periférica de extratos contendo corticoides e a atrofia do córtex adrenal é relatada desde a década de 30 (INGLE; KENDALL, 1937). Sasano e Kitagawa (1964) demonstraram que o tratamento crônico diário com DEX (de 10 a 712 dias) em pacientes com leucemia levou à atrofia severa da glândula adrenal, similar aos pacientes que possuíam panhipopituitarismo. Todavia, o efeito direto da DEX na glândula adrenal é conhecido desde a década de 80, quando pesquisadores observaram que a administração de DEX aumenta a atrofia da glândula adrenal em ratos hipofisectomizados (LOOSE et al., 1980). Entretanto, ainda não é possível discernir os efeitos causados pela falta de peptídeos hipofisários (ACTH e N-POMC) da ação direta da DEX na atrofia da glândula adrenal, uma vez que ambos podem estar ocorrendo concomitantemente (LOOSE et al., 1980).

Nesse modelo utilizado da inibição do eixo HPA pela DEX, o peptídeo N-POMC^{Cys} induziu a proliferação nas ZG e ZR enquanto o N-POMC^{Met} e o ACTH promoveram esse efeito em todas as zonas do córtex adrenal. O resultado da ação do peptídeo N-POMC^{Met} está de acordo com o observado pelo nosso grupo em animais hipofisectomizados (TORRES et al., 2010). No entanto, o peptídeo com os resíduos de serina (N-POMC^{Ser}), que teoricamente mantém o peptídeo linearizado, não promoveu alterações significantes no número de células que incorporaram BrdU, independente da zona analisada.

A sequência de aminoácidos da região N-terminal da POMC é altamente conservada entre os mamíferos (SEGER; BENNETT, 1986), o que sugere um papel biológico importante para este peptídeo. A presença das pontes dissulfeto na extremidade N-terminal da molécula nativa induz a formação de uma estrutura terciária em forma de “hairpin” que parece ser essencial para o direcionamento preciso do peptídeo para a região secretora da célula (DENEFF; ROUDBARAKI; VAN BAEL, 2001). Nesse estudo mostramos que os peptídeos sintetizados com as pontes dissulfeto posicionadas entre as cisteínas (N-POMC^{Cys}), e com as cisteínas substituídas por metioninas, e supostamente sem as pontes dissulfeto (N-POMC^{Met}), apresentaram um efeito proliferativo semelhante. Esses resultados sugerem que a conformação adquirida pelo peptídeo N-POMC^{Met} foi suficiente para a ligação e a ativação de um receptor de membrana.

Embora a estratégia usual para prevenir a formação das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína seja a substituição dos mesmos por serina (comunicação pessoal - Profa. Dra. Maria Teresa Machini / IQ-USP) ou seja, por um aminoácido polar neutro, assim como a cisteína, optamos por preservar o átomo de enxofre na cadeia lateral dos resíduos substituindo as cisteínas por metioninas, um aminoácido apolar. Portanto, podemos sugerir que a adição de resíduos apolares, que são aminoácidos hidrofóbicos, favorece um aumento no número de interações hidrofóbicas na molécula, o que acarretaria uma conformação favorável e até mesmo semelhante à do peptídeo com as pontes dissulfeto, para a ativação de um receptor e o efeito biológico observado. Ou ainda, o fato da cadeia lateral dos resíduos de metionina serem maiores, quando comparado com a cisteína, poderia acarretar uma mudança de conformação na molécula de maneira a torna-la ativa. Além disso, existe um limiar de concentração para a resposta biológica do peptídeo N-POMC^{Met}, pois não observamos efeito proliferativo após tratamento com a concentração fisiológica (10^{-9} M). No entanto, estes dados contrastam com os observados em ratos *Pomc*^{-/-}, pois a administração periférica do peptídeo N-POMC não apresentou alterações no crescimento adrenal, mas redução na ingestão de alimentos e no peso corpóreo (COLL et al., 2006).

Por outro lado, resultados publicados por Fassnacht et al. (2003) demonstraram que o peptídeo sintético N-POMC^{Cys} é capaz de estimular a proliferação das células de tumores adrenocorticais e de células de cultura primária de glândulas suprarrenais de bovinos. Além disso, resultados do nosso grupo, que utilizou culturas primárias de adrenal de rato, detectaram o envolvimento da via de sinalização MAPK-ERK na indução de proliferação das células adrenais (MATTOS et al., 2011). Os resultados da ação do peptídeo N-POMC^{Ser}, que supostamente adquire uma conformação molecular linear foi incapaz de promover a entrada em fase S do ciclo celular em células adrenocorticais. Portanto, esses resultados reforçam a ideia da necessidade de certa conformação, ainda não totalmente compreendida, do peptídeo N-POMC para que esse possa desencadear a atividade biológica.

A diferença observada entre a resposta proliferativa das três zonas que compõem o córtex adrenal após a administração dos diferentes peptídeos sugere, dentre outras possibilidades, o envolvimento da composição da matriz extracelular (MEC) e o microambiente das zonas do córtex adrenal. Existem evidências que a

MEC e as integrinas são diferencialmente expressas no córtex adrenal de ratos e, *in vitro*, a indução da resposta proliferativa do ACTH nas células glomerulosas e fasciculadas depende da composição do substrato a que essas células são expostas para que ocorra a proliferação (OTIS et al., 2007).

A vascularização intraglandular da suprarrenal possui características que sugerem variações quanto à exposição aos diferentes fatores plasmáticos. Portanto, mas de maneira especulativa, essas características poderiam em parte explicar as diferenças observadas na resposta proliferativa entre as diferentes zonas do córtex. A glândula adrenal possui uma circulação sanguínea que começa na periferia do órgão e, centripetamente, atinge a medula sendo drenada por uma única veia. Logo, este tipo de circulação, em teoria, faz com que as células que compõem as diferentes zonas do córtex sejam estimuladas em ordem e concentração diferentes com, por exemplo, os peptídeos derivados da POMC presentes na circulação (para revisão BASSETT; WEST, 1997). Este provável gradiente de difusão e consequente concentração dos peptídeos derivados da POMC poderia influenciar na resposta proliferativa das diferentes zonas do córtex. Além disso, em decorrência da circulação centrípeta do órgão, existe a possibilidade de que fatores parácrinos produzidos, por exemplo, pelas células das zona mais externa em resposta à um estímulo, possam por sua vez modular a resposta das células das zonas mais internas do córtex. Apesar de não existirem estudos que confirmem tal hipótese, existem evidências da produção de fatores parácrinos pelas células do córtex adrenal e sua influência nas células da medula (para revisão, EHRHAT-BORNSTEIN; BORNSTEIN, 2008).

Com relação à ação trófica do ACTH no córtex adrenal nossos resultados estão de acordo com os resultados previamente descritos por outros e pelo nosso grupo (BACCARO et al., 2007; MALENDOWICZ et al., 1992; PIGNATELLI et al., 2002; TORRES; LOTFI, 2007). No entanto, dentre os peptídeos N-POMC estudados, nenhum potencializou a ação do ACTH, o que sugere mecanismos diferentes de ação, apesar de serem produtos do processamento de um mesmo peptídeo precursor. Diferentemente dos efeitos *in vivo*, os resultados da ação do ACTH *in vitro* em linhagem de tumor de suprarrenal de camundongo (células Y-1) mostraram que pulsos de ACTH produzem um efeito mitogênico fraco enquanto tratamentos prolongados um efeito antimitogênico forte (LOTFI et al., 1997). No entanto, resultados mais recentes mostraram que culturas primárias de suprarrenal de ratos,

tratadas com ACTH, não apresentam o efeito mitogênico observado na linhagem tumoral de camundongo Y-1, sugerindo que essa resposta possa ser uma característica de células tumorais (MATTOS; LOTFI, 2005).

5.3 O mecanismo de ação do ACTH e N-POMC através da análise da expressão das proteínas de ciclo celular: a expressão protéica das ciclinas e de p27^{Kip1}

Para o estudo dos mecanismos de ação dos peptídeos no ciclo celular do córtex adrenal foi necessário estabelecer um protocolo de separação das zonas que permitisse a quantificação das proteínas de interesse. Além disso, esse método complementaria a análise por imunoistoquímica que permite a localização das células nas zonas que expressam a proteína em estudo. Portanto, a primeira etapa foi a de caracterização do modelo experimental, isto é, das frações externa e interna obtidas, adaptando um protocolo já utilizado no laboratório para preparação das culturas de células primárias de adrenal de rato (MATTOS; LOTFI, 2005). Os resultados da análise das frações obtidas mostraram a ausência de expressão da enzima aldosterona sintase (Cyp11b2) na fração mais interna (FI) da glândula, o que está dentro do esperado, uma vez que essa enzima é expressa somente na ZG. Além disso, a quantificação da enzima tirosina hidroxilase (TH) na FI, enzima essa somente expressa na medula adrenal, mostrou que o procedimento de retirada de parte da medula é eficiente, e sem que haja prejuízo na qualidade da amostra obtida. Concluindo, a separação das frações da adrenal é uma estratégia satisfatória para a obtenção de ácidos nucleicos e de proteínas das zonas do córtex de adrenais.

Pela utilização de dois métodos complementares, "immunoblotting" e imunoistoquímica, foi realizada a análise da expressão de proteínas, de maneira a relacionar o padrão de expressão das principais ciclinas envolvidas na transição G1-S com a proliferação promovida pelo ACTH, N-POMC^{Met} e N-POMC^{Cys} no córtex da suprarrenais de ratos.

De uma forma geral nossos dados mostram que há expressão proteica basal das ciclinas D em todo córtex, sendo essa expressão mais elevada na ZG do que na ZF e ZR. Essa diferença pode estar relacionada com alguns dados que sugerem que

as células da ZG e sub-capsulares são as principais células progenitoras do córtex adrenal (KING; PAUL; LAUFER, 2009).

A inibição do eixo HPA através do tratamento com DEX diminui a capacidade de proliferar das células da ZG e ZF, bloqueando-a completamente na ZR. Tal efeito biológico foi precedido pela diminuição da expressão das proteínas ciclinas D2 e D3, em ambas as frações do córtex adrenal estudadas, e uma inibição na expressão da ciclina E na porção mais externa do córtex. Logo, podemos relacionar a falta de estímulos proliferativos devido à diminuição dos peptídeos derivados da POMC, que deixam de estimular a expressão das ciclinas D2, D3 e E no córtex adrenal, resultando na diminuição do número de células adrenocorticais em fase S do ciclo celular.

Quando os animais, com o eixo HPA inibido pela DEX, foram injetados com ACTH e/ou N-POMC^{Met} ou N-POMC^{Cys} observamos um aumento na proliferação de células do córtex e um aumento zona-dependente na expressão das ciclinas D e E, em função do tratamento utilizado. Embora a proteína ciclina D1 tenha sido a proteína que apresentou a menor variação de expressão em função dos tratamentos, essa proteína foi aumentada na FE após tratamento com a N-POMC com as pontes dissulfeto. Esses resultados contrastam com o observado por Coulter et al. (2002) que utilizaram um sistema de infusão da glândula adrenal em fetos de ovelhas no estudo da relação entre o envolvimento da ciclina D1 na resposta proliferativa desencadeada pelos peptídeos N-POMC₁₋₇₇ e N-POMC₁₋₄₉, nas células adrenocorticais. Esse trabalho concluiu que a expressão da ciclina D1 não foi alterada pelo estímulo dos peptídeos utilizados. Por outro lado, a ciclina D1 parece estar envolvida com a proliferação e diferenciação do córtex fetal de babuínos (DUMITRESCU et al., 2007). A ciclina D1 também parece estar envolvida na resposta proliferativa desencadeada pela ação da angiotensina II na linhagem de tumor adrenocortical humano, células NCI-H295 (WATANABE et al., 1996). Por outro lado, a vasopressina promove uma diminuição da expressão de ciclina D1 em células tumorais de camundongo Y-1, o que acarreta um efeito anti-mitogênico (SCHIWNDDT et al., 2003).

Os resultados da expressão da ciclina D2 mostraram que a expressão desta proteína diminuiu na FI da glândula adrenal, após a inibição dos peptídeos endógenos pela DEX. Entretanto, a administração do peptídeo sem as pontes N-POMC^{Met} recuperou a expressão de D2 nesta fração, enquanto que o peptídeo com

as pontes promoveu um aumento da expressão da ciclina D2 na FE. No entanto, o ACTH não modulou a expressão desta da ciclina D2. Estes resultados podem refletir as diferenças nos mecanismos de ação dos peptídeos estudados. Apesar de serem derivados de um pró-homônio em comum (POMC), somente os peptídeos provenientes da porção mais N-terminal foram capazes de restaurar a expressão da ciclina D2 na glândula adrenal, o que sugere que estes peptídeos induzem a síntese de DNA de maneira distinta do ACTH.

Ao analisarmos os resultados obtidos da expressão da ciclina D3 através de imunofluorescência, observamos que há uma diminuição na expressão dessa proteína em todo o córtex em animais com o eixo HPA suprimido, em relação aos animais com o eixo intacto, que são os tratados com salina. Entretanto, de maneira não esperada a inibição do eixo HPA promoveu um aumento na marcação desta ciclina nas células que compõem a cápsula da glândula, concomitante com o aumento de expressão da proteína PCNA nessas células. Existem evidências que as células da cápsula da suprarrenal e as células subcapsulares sejam nichos de células progenitoras do córtex adrenal e portanto responsáveis pela manutenção das células do córtex, fornecendo células indiferenciadas para repopular suas zonas (para revisão SIMON; HAMMER, 2012; WOOD; HAMMER, 2011). Os resultados do tratamento com ACTH mostraram que houve um aumento na marcação de células ciclinas D3-positivas na porção interna do córtex, enquanto que a administração de N-POMC^{Cys} aumentou a expressão da ciclina D3 na ZF e ZG. A análise da expressão dessa proteína por "immunoblotting" mostra que tanto o tratamento com N-POMC^{Cys} quanto com ACTH não modularam a expressão da ciclina D3 na FE, mas somente na FI da glândula. Essa diferença de expressão em função do método utilizado é esperado, uma vez que são métodos complementares. Além disso, o anticorpo utilizado pode, dependendo da abordagem experimental, ter especificidade e precisão de detecção variáveis.

Embora as ciclinas D1, D2 e D3 apresentem uma homologia de 75%-78% na sequência de aminoácidos da região chamada caixa da ciclina ("cyclin-box"), aonde as CDKs se ligam, a homologia fora desta região é de apenas 39%-37% (INABA et al., 1992; XIONG et al., 1991). É possível então que cada ciclina D possa exercer funções não redundantes e que sejam, possivelmente tecido-específicas (CIEMERYCH et al., 2002). Trabalhos que utilizaram linhagens de camundongos que não expressam ciclina D1 ou D2 ou D3 mostraram que os três tipos de animais

são viáveis (FANTL et al., 1995). Entretanto, a falta da ciclina D1 ocasiona problemas no desenvolvimento neuronal assim como na retina e glândulas mamárias tornando-as hipoplásicas (FANTL et al., 1995; SICINSKI et al., 1995). Animais deficientes para ciclina D2 apresentaram problemas no desenvolvimento das gônadas (SICINSKI et al., 1996) além de anormalidades no cerebelo e nos linfócitos B (HUARD et al., 1999; LAM et al., 2000; SOLVASON et al., 2000). Por fim, animais que não expressaram ciclina D3 tiveram um comprometimento no desenvolvimento dos linfócitos T (SICINSKA et al., 2003). A desregulação na expressão da ciclina D1, e em menor grau nas demais ciclinas D, está associada à vários tipos de tumores, tornando-a um alvo terapêutico em potencial para diversos tipos de cânceres (para revisão, MUSGROVE et al., 2011).

De maneira especulativa podemos sugerir que a ciclina D1 parece ser a menos envolvida com a resposta proliferativa promovida por fatores derivados da POMC. De fato, a inibição do eixo HPA, alterou a expressão de todas as outras ciclinas, mas não expressão da ciclina D1. Além disso, somente um dos peptídeos N-POMC, a N-POMC^{Cys}, modula a expressão da ciclina D1 e somente na fração mais externa do córtex adrenal. O mesmo não acontece com as ciclinas D2 e D3, pois ambas são reguladas em função da ausência ou presença dos peptídeos ACTH e N-POMC.

Além das ciclinas D, outra proteína fundamental para a promoção da transição G1 para S é a ciclina E. Existem trabalhos que demonstraram certa independência tempo-funcional entre os complexos ciclina D/CDK6 e ciclina E/CDK2, uma vez que foi demonstrado que células de ovário de hamster, quando tratadas com um inibidor da ciclina D1 e estimuladas a expressar ciclina E, entraram na fase S. Portanto, esses resultados sugerem que a atividade do complexo ciclina E/CDK2 pode prescindir de um acúmulo da ciclina D1/CDK6 para a transição G1 para S. Logo, o acúmulo de fatores de transcrição E2f disponíveis para a progressão no ciclo celular parece ser o determinante para o aumento da expressão da ciclina E (KEENAN; LENTS; BALDASSARE, 2004). Nossos resultados sobre a expressão de ciclina E demonstram que há expressão basal desta ciclina, e que essa proteína está altamente expressa no córtex adrenal. Além disso, a inibição do eixo HPA pela ação da DEX, diferentemente do observado nas zonas mais internas, diminuiu a expressão da ciclina E na região mais externa do córtex. Animais tratados com os peptídeos da POMC aumentaram a expressão da ciclina E na região externa do

córtex, independente da abordagem experimental utilizada, o que sugere, fortemente, uma relação entre a ação proliferativa desses peptídeos e a expressão da ciclina E, na região mais externa do córtex. Esses achados são reforçados por resultados que descrevem tumores adrenais com expressão aumentada de ciclina E e prognóstico menos favorável (BOURCIGAUX et al., 2000; TISSIER et al., 2004).

Em resumo, nossos resultados sugerem uma relação entre a sinalização desencadeada pelo acúmulo da ciclina D2 e D3 e a transição G1-S nas zonas mais internas do córtex, e na zona mais externa, a expressão de ciclina E como fator determinante para o efeito proliferativo.

A análise da expressão da proteína p27^{Kip1}, um inibidor de ciclo celular, mostrou que essa proteína está expressa em todo o córtex. No entanto, após inibição do eixo HPA, foi observado um aumento dessa proteína nas regiões mais internas do córtex. O tratamento dos animais com ACTH altera a expressão dessa proteína com um aumento inicial, o que não é esperado para um fator envolvido na progressão G1-S, seguido da diminuição de sua expressão. Esse resultado sugere o envolvimento desse inibidor do ciclo celular no efeito proliferativo, em particular da região mais externa do córtex. Nossos resultados estão de acordo com os dados apresentados por Kobayashi et al. (2006) que demonstraram pela primeira vez *in vivo* que o ACTH pode modular a proliferação e a diferenciação das células adrenocorticais na zona glomerulosa diminuindo a expressão de p27^{Kip1}, e com isso determinando essa zona como o local da ação mitogênica do ACTH. Portanto, nossos resultados estão de acordo com o observado sobre a ação do ACTH na diminuição de p27^{Kip1} na ZG, mas ao mesmo tempo em desacordo com o observado com o restante da glândula, pois mostramos que a regulação de p27^{Kip1} esteve envolvida também no controle da proliferação nas zonas mais internas do córtex.

A administração dos peptídeos N-POMC, mostra, independente da presença das pontes dissulfeto, uma diminuição na expressão da proteína p27^{Kip1}. A ação do peptídeo N-POMC^{Met} em conjunto com ACTH mostrou que o tratamento é eficaz na diminuição da expressão de p27^{Kip1} em todo o córtex adrenal. Esses resultados reforçam o papel desta proteína e sua inibição para a proliferação das células adrenais. A diminuição da expressão dessa proteína pode ser decorrente de um processo de degradação através de ubiquitinação (para revisão, KITAGAWA; KOTAKE; KITAGAWA, 2009). Esta degradação de inibidor de CDK pode ser importante para que os complexos ciclina D/CDK4-6 e ciclina E/CDK2 possam ser

ativados e atuarem em eventos importantes na transição G1/S (RAY et al., 2009). Trabalhos *in vitro* demonstraram que a angiotensina II promove uma diminuição na proliferação de células de cultura primária de ZG, concomitantemente com um aumento na expressão de p27^{Kip1}, o que reforça o papel desta proteína na regulação do ciclo celular dessas células do córtex adrenal (OTIS et al., 2005).

Dados da literatura mostram que animais *p27^{-/-}* são maiores que os animais selvagens, com órgãos como timo, hipófise, gônadas e adrenais com tamanhos aumentados, sem a presença de tumores, a não ser na hipófise. Além disso, nesses animais não houve alteração da concentração de corticosterona, e a análise histológica mostrou acentuada hiperplasia da medula adrenal, mas o córtex se manteve relativamente normal (NAKAYAMA et al., 1996). No entanto, outra proteína membro da família Kip/Cip, pode ser importante para o controle da proliferação no córtex adrenal: a proteína p57. Animais *p57^{-/-}* apresentaram um aumento no peso da glândula decorrente de uma hiperplasia das células do córtex quando comparados a animais selvagens, além disso a expressão de p57 parece estar restrita ao córtex adrenal (ZHANG et al., 1997; NAGAHAMA et al., 2001).

5.4 Os mecanismos de ação dos peptídeos através da análise da expressão dos genes reguladores do ciclo celular

De uma maneira geral, os genes que foram analisados podem ser divididos em genes reguladores positivos e negativos do ciclo celular, de forma que o equilíbrio e o resultado final da expressão dos dois grupos de genes podem determinar o mecanismo da resposta mitogênica desencadeada por certo estímulo. No entanto, iremos discutir aqueles genes diferencialmente expressos que apresentaram uma maior expressão ou repressão, desencadeada pelos diferentes peptídeos estudados, em ambas as frações adrenais. Desta forma, elaboramos duas tabelas que sumarizam quais os genes analisados que apresentam maiores níveis de expressão ou repressão em número de vezes, em relação aos controles na FI (Quadro 2) e na FE (Quadro 3).

Quadro 2- Genes relacionados ao controle do ciclo celular diferencialmente expressos na fração interna (FI) do córtex adrenal de ratos

Tratamentos	Genes reprimidos	Genes hiperexpressos
Inibição do eixo HPA	<i>Nek2</i> * > <i>Ccnb2</i> > <i>Chk1</i> > <i>Apbb1</i> > <i>Ccnf</i> > <i>Cdkn2a</i>	<i>Rbl1</i> *
ACTH	<i>Tp63</i> *	<i>Ccna2</i> * > <i>Nek2</i>
N-POMC ^{Met}	<i>Npm2</i> *	<i>Ccna2</i> *
N-POMC ^{Cys}	-	<i>Ccna2</i> *

* Genes mais expressos em relação ao controle

Quadro 3- Genes relacionados ao controle do ciclo celular diferencialmente expressos na fração externa (FE) do córtex adrenal de ratos

Tratamentos	Genes reprimidos	Genes hiperexpressos
Inibição do eixo HPA	<i>Nek2</i> * > <i>Ccnb2</i> > <i>Ccnb1</i> > <i>Ccna2</i> > <i>Ccnf</i> > <i>Rad51</i> > <i>Brca1</i>	<i>Gpr132</i> * > <i>Tp63</i>
ACTH	<i>Terf1</i> * > <i>Dnajc2</i> > <i>Dst</i> > <i>Cdkn1a</i> > <i>Prm1</i>	<i>LOC307231</i> *
N-POMC ^{Met}	<i>Nek2</i> * > <i>Cdkn2a</i>	<i>Cdc25b</i> *
N-POMC ^{Cys}	<i>Ccne1</i> * > <i>E2f1</i> > <i>Npm2</i>	<i>Cdkn2a</i> * > <i>LOC307231</i> > <i>Pkd1</i>

* Genes mais expressos em relação ao controle

A análise da expressão gênica das frações adrenais mostrou que a inibição do eixo HPA promoveu um aumento nas expressões de *Gpr132* e de *Rbl1*, respectivamente na FE e FI, assim como uma diminuição de *Nek2* em ambas. A proteína *Gpr132* é um membro da família dos receptores ligados a proteína G e sua hiperexpressão em fibroblastos está relacionada com a parada do ciclo na fase

G2/M (WENG et al., 1998). Esse fato sugere sua participação na inibição de proliferação na adrenal, após a retirada dos peptídeos da POMC.

A proteína Rbl, segundo Singh, Coe e Hong (1995), parece interagir e facilitar a resposta transcricional mediada pelos receptores de glicocorticoides. Logo, se ocorrer um efeito direto da DEX nas células adrenais, esse pode desencadear o aumento de *Rbl1*, uma vez que é conhecida a existência de receptores deste tipo na adrenal (LOOSE et al., 1980). O hiperexpressão das proteínas da família Rbl promove um aumento na formação de complexos E2f-Rbl, ou seja, diminui a disponibilidade de fatores de transcrição E2f livres, o que resulta na parada do ciclo celular (para revisão, SUN et al., 2007). Logo, a falta dos peptídeos da POMC, ACTH e o N-POMC, e/ou o efeito direto da ação da DEX na adrenal hiperexpressaram *Rbl1*, favorecendo a parada do ciclo celular.

Somada à ação de Rbl1, a inibição do eixo HPA, parece envolver a diminuição da expressão de uma série de genes relacionados com a progressão do ciclo celular. Dentre eles a quinase relacionada a NIMA (*Nek2*), uma enzima quinase serina / treonina localizada no centrôssomo, que regula a coesão e a separação do centrôssomo através de fosforilação de seus componentes estruturais. Em células de mamíferos a *Nek2* possuiu três isoformas conhecidas: *Nek2A*, *Nek2B* e *Nek2C* (WU et al., 2007). Além disso, a hiperexpressão de *Nek2* está relacionada com a tumorigênese da mama (TSUNODA et al., 2009). Apesar de não haver na literatura informações sobre a importância da expressão de *Nek2* em tumores de adrenal ou mesmo em adrenais normais, Bahmanyar et al. (2007) observaram que para ocorrer a separação dos centrôssomos em células mitóticas é necessária a presença de um dos substratos de *Nek2*, a beta-catenina, descrita como um componente do centrôssomo na interfase. Portanto, esses resultados sugerem que a menor concentração dos peptídeos POMC circulantes diminui o número de células em proliferação no córtex adrenal, provavelmente com o envolvimento de inibição de *Nek2* e aumento da expressão de *Gpr132* e *Rbl1*.

O tratamento com ACTH promoveu, na FI, uma reversão na inibição de *Nek2* causada pela inibição do eixo HPA, com hiperexpressão desse gene e aumento da expressão do gene *Ccna2*. O gene *Ccna2* codifica a proteína ciclina A2, que parece ser necessária para as fases S e M do ciclo celular (PAGANO et al., 1992). Alguns estudos demonstraram que quando hiperexpressa, a ciclina A2 tem a capacidade de acelerar a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular, promovendo assim a

replicação do DNA (D'URSO et al., 1990; RESNITZKY; REED, 1995). Além disso, a inibição da ciclina A2 obtida através de DNA anti-senso específico mostrou que não ocorreu a replicação do DNA, acarretando parada no ciclo celular (ZINDY et al., 1992).

Por outro lado, o gene *Tp63* (anteriormente denominado de *Tp73*) foi reprimido, e sua proteína juntamente com a proteína p73 são membros da família de proteínas supressoras de tumor, das quais a mais conhecida e que foi o primeiro descrita é a proteína p53. Todos os três genes regulam o ciclo celular e a apoptose após dano no DNA (MOLL; SLADE, 2004). No entanto, a proteína p63 também parece relacionada com a supressão de metástase, além de exercer um papel fundamental no desenvolvimento da epiderme (para revisão, MELINO, 2011). Por outro lado, em células de diferentes carcinomas escamosos foi detectada amplificação de p63 e hiperexpressão de sua isoforma, a p Δ N63, relacionadas a aumento de crescimento oncogênico, *in vivo* e *in vitro*. Esse aumento está relacionado com a inibição da fosforilação de beta-catenina, acarretando seu acúmulo nuclear e a ativação da sinalização relacionada à via Wnt (PATTURAJAN et al., 2002).

Na FE o tratamento com ACTH promoveu a hiperexpressão de *Loc307231*, gene identificado como similar ao gene do fator nuclear de células T ativadas c1 (*Nfatc1*). As proteínas desta família de fatores de transcrição desempenham um papel fundamental na transcrição gênica durante a resposta imune (NORTHROP et al., 1994). Quando hiperexpresso em células da musculatura lisa vascular, *Nfatc1* promove um aumento nas expressões da ciclina A2 (KARPURAPU et al., 2008) e ciclina D1 (KARPURAPU et al. 2010), induzindo proliferação celular. Sendo assim, a hiperexpressão deste gene após o estímulo com ACTH na FE do córtex adrenal sugere uma ativação da progressão do ciclo celular, apesar desse gene, até aonde sabemos, nunca estar relacionado com o córtex adrenal. Nesta mesma fração ocorreu a repressão de *Terf1* ("telomeric repeat binding factor protein"), gene que codifica uma proteína específica do telômero que faz parte do complexo núcleo-proteico dessa região do cromossomo. Esta proteína está presente nos telômeros ao longo do ciclo celular e age como um inibidor da telomerase (SHEN et al., 1997). Além disso, *Terf1* é hiperexpresso na fase G2 e M e pode ser importante para o controle de eventos na mitose, como o controle da integridade do telômero (SHEN et al., 1997).

Assim como o ACTH, o peptídeo N-POMC^{Met} também induziu o gene *Ccna2* (ciclina A2) na FI, o que reforça a participação e importância dessa ciclina na resposta proliferativa do córtex adrenal. Entretanto, nesta mesma fração foi observada a repressão da transcrição do gene *Npm2* que faz parte da família das chaperonas nucleares denominada nucleoplasminas. A proteína Npm2 interage com histonas presentes na cromatina, e está relacionada com a correta manutenção da estrutura do núcleo e do nucléolo (BURNS et al., 2003). Na FE, a ação da N-POMC^{Met} inibiu a expressão do gene *Nek2* e induziu a do gene *Cdc25b*. O gene *Cdc25b* é uma fosfatase da família CDC25 que parece ser essencial para a ativação do complexo CDK1/Ciclina B1 e consequentemente para a transição da fase G2/M (KIYOKAWA; RAY, 2008).

Diferentemente da ação do peptídeo N-POMC^{Met} na FE, o peptídeo N-POMC^{Cys}, com as pontes, diminuiu a transcrição do gene da ciclina E1 nesta fração. Curiosamente, nesta mesma fração, nossos resultados mostraram hiperexpressão proteica desta ciclina após o mesmo tratamento. Esses resultados demonstram que existe uma regulação para reprimir a transcrição do gene da ciclina E após o acúmulo da proteína. De fato, caso esta inibição não ocorresse, estaríamos lidando com uma célula que perdeu o controle do ciclo celular, assim como ocorre na maioria das células tumorais.

O N-POMC^{Cys} causou, nesta mesma fração, a hiperexpressão do gene da ciclina A2 e do gene *Cdkn2a*. Este último é um gene supressor de tumor que codifica a proteína p16INK4, cuja ação é inibir as quinases dependentes de ciclina (CDKs) 4 e 6. A inibição das CDKs previne a fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb) e bloqueia a progressão da fase G1 para a S do ciclo celular (STRAUSS; LUKAS; BARTEK, 1995). A desregulação de p16INK4 leva a uma perda do controle da proliferação celular e sua diminuição pode contribuir para o surgimento de neoplasias, inclusive o carcinoma adrenocortical (PILON et al., 1999).

Em resumo, estes resultados demonstram que as diferentes zonas que constituem o córtex adrenal respondem de forma distinta aos estímulos promovidos pelos peptídeos derivados da POMC. Essas respostas envolvem genes diferencialmente expressos, relacionados com o ciclo celular na promoção da transição G1-S, e, consequentemente, na proliferação. Pela validação da variabilidade de expressão proteica dos genes estudados, poderemos propor outros

elementos que participam dos mecanismos de ação pelo qual os peptídeos da POMC induzem a proliferação no córtex adrenal.

6 CONCLUSÕES

- O protocolo de tratamento com DEX para inibir o eixo HPA foi estabelecido e mostrou-se eficiente;
- os peptídeos N-POMC 1-28, tanto com resíduos de metionina quanto com as pontes dissulfeto, promoveram um aumento no número de células que entraram na fase S do ciclo celular no córtex adrenal, corroborando com a idéia de que os peptídeos N-terminais da POMC, juntamente com o ACTH, podem exercer um papel fisiológico na manutenção da glândula adrenal;
- a inibição do eixo HPA diminuiu a expressão das proteínas da família das ciclinas e seu inibidor, que foi revertida de maneira proteína-zona-específica após a administração dos peptídeos da POMC. Especificamente as ciclinas D2 e D3 parecem estar relacionadas com o aumento da proliferação das regiões mais internas do córtex adrenal enquanto as ciclinas D1 e E nas regiões mais externas da glândula. A inibição da proteína p27^{Kip1} ocorre em todo o córtex da glândula independente do tratamento utilizado. Dos genes analisados nas frações do córtex adrenal estudadas, destacamos a modulação da expressão dos genes *Nek2*, *Tp63*, *Npm2*, *Rbl1*, *Ccna2* (ciclina A2), *Terf1*, *Gpr132*, *Cdkn2a*, *Cdc25b*, *Ccne1* (ciclina E1) e LOC307231 (*Nfatc1*).

Portanto, nosso trabalho contribui para o melhor entendimento dos mecanismos de manutenção e renovação do córtex adrenal de ratos pelos peptídeos derivados da POMC (ACTH e N-POMC), atuando na modulação de genes e proteínas relacionados com o ciclo celular.

REFERÊNCIAS*

- BACCARO, R. B. et al. 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.
- BAHMANYAR, S. et al. β -Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation. **Genes & Development**, v. 22, n. 1, p. 91-105, 2008.
- BASSETT, J. R.; WEST, S. H. Vascularization of the adrenal cortex: its possible involvement in the regulation of steroid hormone release. **Microsc. Res. Tech.**, v. 36, n. 6, p. 546-557, 1997.
- BERTAGNA, X. Y. et al. Simultaneous Assay of Immunoreactive β -Lipotropin, γ -Lipotropin, and β -Endorphin in Plasma of Normal Human Subjects, Patients with ACTH/Lipotropin Hypersecretory Syndromes, and Patients undergoing Chronic Hemodialysis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 67, n. 1, p. 124-133, 1981.
- BICKNELL, A. B. et al. Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. **Cell**, v. 105, n. 7, p. 903-912, 2001.
- BICKNELL, A. B. The Tissue-Specific Processing of Pro-Opiomelanocortin. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 692-699, 2008.
- BOURCIGAUX, N. et al. High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, n. 1, p. 322-330, 2000.
- BURNS, K. H. et al. Roles of NPM2 in Chromatin and Nucleolar Organization in Oocytes and Embryos. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 633-636, 2003.
- CECCATELLI, S. et al. Adrenocortical apoptosis in hypophysectomized rats is selectively reduced by ACTH. **Neuroreport**, v. 6, n. 2, p. 342-344, 1995.
- CHAN, J. S. D.; SEIDAH, N. G.; CHRÉTIEN, M. Measurement of N-Terminal (1–76) of Human Proopiomelanocortin in Human Plasma: Correlation with Adrenocorticotropin. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 56, n. 4, p. 791-796, 1983.
- CHROUSOS, G. P. Is 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 a good therapeutic target for blockade of glucocorticoid actions? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 17, p. 6329-6330, 2004.
- CHU, I. et al. p27 Phosphorylation by Src Regulates Inhibition of Cyclin E-Cdk2. **Cell**, v. 128, n. 2, p. 281-294, 2007.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CIEMERYCH, M. A. et al. Development of mice expressing a single D-type cyclin. **Genes & Development**, v. 16, n. 24, p. 3277-3289, 2002.

CLARKE, A. P. et al. An Integrated Amperometry Waveform for the Direct, Sensitive Detection of Amino Acids and Amino Sugars Following Anion-Exchange Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2774-2781, 1999.

COLL, A. P. et al. Peripheral administration of the N-terminal pro-opiomelanocortin fragment 1-28 to Pomc^{-/-} mice reduces food intake and weight but does not affect adrenal growth or corticosterone production. **J. Endocrinol.**, v. 190, n. 2, p. 515-525, 2006.

COULTER, C. L. et al. Effect of N-proopiomelanocortin (1-77) and (1-49) infusions on adrenal expression of cyclin D1 in the fetal sheep. **Endocr. Res.**, v. 28, n. 4, p. 625-629, 2002.

DALLMAN, M. F. Control of adrenocortical growth in vivo. **Endocr. Res.**, v. 10, n. 3-4, p. 213-242, 1984.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. Sistema endócrino. In:_____. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 199-203.

DAVIS, K. T. et al. Hypophysectomy Results in a Loss of Connexin Gap Junction Protein from the Adrenal Cortex. **Endocrine Research**, v. 26, n. 4, p. 561-570, 2000.

DENEF, C.; ROUDBARAKI, M.; VAN BAEL, A. Growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain of pro-opiomelanocortin. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 28, n. 3, p. 239-243, 2001.

DUMITRESCU, A. et al. Developmental expression of cell cycle regulators in the baboon fetal adrenal gland. **J. Endocrinol.**, v. 192, n. 1, p. 237-247, 2007.

D'URSO, G. et al. Cell cycle control of DNA replication by a homologue from human cells of the p34cdc2 protein kinase. **Science**, v. 250, n. 4982, p. 786-791, 1990.

EHRHART-BORNSTEIN, M.; BORNSTEIN, S. R. Cross-talk between Adrenal Medulla and Adrenal Cortex in Stress. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1148, n. 1, p. 112-117, 2008.

ESTIVARIZ, F. E. et al. Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides. **Nature**, v. 297, n. 5865, p. 419-422, 1982.

FANTL, V. et al. Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. **Genes & Development**, v. 9, n. 19, p. 2364-2372, 1995.

FASSNACHT, M. et al. N-terminal proopiomelanocortin acts as a mitogen in adrenocortical tumor cells and decreases adrenal steroidogenesis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, n. 5, p. 2171-2179, 2003.

GUARDIOLA-DIAZ, H. M. et al. Negative glucocorticoid regulation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-stimulated corticotropin-releasing hormone-reporter expression in AtT-20 cells. **Molecular Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 317-329, 1996.

HALL, M.; BATES, S.; PETERS, G. Evidence for different modes of action of cyclins dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinase, p21 and p27 bind cyclins. **Oncogene**, v. 11, p. 1581-1588, 1995.

HUARD, J. M. T. et al. Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. **Development**, v. 126, n. 9, p. 1927-1935, 1999.

INABA, T. et al. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. **Genomics**, v. 13, n. 3, p. 565-574, 1992.

INGLE, D. J.; KENDALL, E. C. Atrophy of the adrenal cortex of the rat produced by administration of large amounts of cortin. **Science**, v. 86, n. 2228, p. 245, 1937.

KANT, G. J. et al. Dexamethasone suppresses ACTH release without attenuating pituitary cyclic AMP response to stress in vivo. **Life Sci.**, v. 45, n. 2, p. 125-131, 1989.

KARPURAPU, M. et al. Cyclin D1 is a bona fide target gene of NFATc1 and is sufficient in the mediation of injury-induced vascular wall remodeling. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 5, p. 3510-3523, 2010.

KARPURAPU, M. et al. NFATc1 targets cyclin A in the regulation of vascular smooth muscle cell multiplication during restenosis. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 39, p. 26577-26590, 2008.

KAWAUCHI, H.; TAKAHASHI, A.; ABE, K.-I. Gamma-melanotropin is not present in an N-terminal peptide of salmon proopiomelanocortin. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 18, n. 3, p. 223-227, 1981.

KEENAN, S. M.; LENTS, N. H.; BALDASSARE, J. J. Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, activation of E2F, and G1-S phase progression. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 7, p. 5387-5396, 2004.

KING, P.; PAUL, A.; LAUFER, E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 50, p. 21185-21190, 2009.

KITAGAWA, K.; KOTAKE, Y.; KITAGAWA, M. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. **Cancer Sci.**, v. 100, n. 8, p. 1374-1381, 2009.

KIYOKAWA, H.; RAY, D. In vivo roles of CDC25 phosphatases: biological insight into the anti-cancer therapeutic targets. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 8, n. 8, p. 832-836, 2008.

KOBAYASHI, H. et al. Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p27Kip1 and p57Kip2, by corticotropin in rat adrenal cortex. **J. Endocrinol.**, v. 189, n. 3, p. 671-679, 2006.

KONTULA, K. et al. Glucocorticoid Receptors and Responsiveness of Normal and Neoplastic Human Adrenal Cortex. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 60, n. 2, p. 283-289, 1985.

LALLI, E. Adrenal cortex ontogenesis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 6, p. 853-864, 2010.

LAM, E. W. F. et al. Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse D-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 5, p. 3479-3484, 2000.

LE GOASCOGNE, C. et al. Immunoreactive cytochrome P-45017 α in rat and guineapig gonads, adrenal glands and brain. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 2, p. 609-622, 1991.

LOOSE, D. S. et al. Demonstration of Glucocorticoid Receptors in the Adrenal Cortex: Evidence for a Direct Dexamethasone Suppressive Effect on the Rat Adrenal Gland. **Endocrinology**, v. 107, n. 1, p. 137-146, 1980.

LOTFI, C. F. et al. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 47, p. 29886-29891, 1997.

LOWRY, P. J. et al. Pro-gamma-melanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth. **Nature**, v. 306, n. 5938, p. 70-73, 1983.

MALENDOWICZ, L. K. et al. Analysis of the preventive action of ACTH on dexamethasone-induced adrenocortical atrophy in the rat. **Cytobios**, v. 71, n. 286-287, p. 191-199, 1992.

MATTOS, G. et al. Comparative effect of FGF2, synthetic peptides 1-28 N-POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures. **Cell Tissue Res.**, v. 345, n. 3, p. 343-356, 2011.

MATTOS, G. E.; LOTFI, C. F. Differences between the growth regulatory pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 245, n. 1-2, p. 31-42, 2005.

MEIKLE, A. W.; TYLER, F. H. Potency and duration of action of glucocorticoids: Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. **The American Journal of Medicine**, v. 63, n. 2, p. 200-207, 1977.

MELINO, G. p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. **Cell Death Differ.**, v. 18, n. 9, p. 1487-1499, 2011.

- MIGEON, C. J. et al. In vivo distribution of some 17-hydroxycorticosteroids between the plasma and red blood cells of man. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 11, p. 1411-1419, 1959.
- MOLL, U. M.; SLADE, N. p63 and p73: Roles in Development and Tumor Formation¹¹National Cancer Institute. **Molecular Cancer Research**, v. 2, n. 7, p. 371-386, 2004.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. O sistema urogenital. In:_____. **Embriologia básica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 178-182.
- MORGAN, D. O. Principles of CDK regulation. **Nature**, v. 374, n. 6518, p. 131-134, 1995.
- MORLEY, S. D. et al. Variegated expression of a mouse steroid 21-hydroxylase/beta- galactosidase transgene suggests centripetal migration of adrenocortical cells. **Mol. Endocrinol.**, v. 10, n. 5, p. 585-598, 1996.
- MUSGROVE, E. A. et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, n. 8, p. 558-572, 2011.
- NAGAHAMA, H. et al. Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 during mouse development. **Anat. Embryol. (Berl.)**, v. 203, n. 2, p. 77-87, 2001.
- NAKAYAMA, K. et al. Mice Lacking p27Kip1 Display Increased Body Size, Multiple Organ Hyperplasia, Retinal Dysplasia, and Pituitary Tumors. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 707-720, 1996.
- NEW, M. I. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. **Annu. Rev. Med.**, v. 49, p. 311-328, 1998.
- NORTHROP, J. P. et al. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. **Nature**, v. 369, n. 6480, p. 497-502, 1994.
- ORTH, D. N.; KOVACS, W. J. The adrenal cortex. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W.; KRONENBERG, H. M.; LARSEN, P. R. **Willians textbook of endocrinology**. 9th ed. Philadelphia: Saunders Book Company, 1998. p. 517-664.
- OTIS, M. et al. Angiotensin II stimulates protein synthesis and inhibits proliferation in primary cultures of rat adrenal glomerulosa cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 633-642, 2005.
- OTIS, M. et al. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. **J. Endocrinol.**, v. 193, n. 3, p. 331-347, 2007.
- PAGANO, M. et al. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. **Embo J.**, v. 11, n. 3, p. 961-971, 1992.

PAPADIMITRIOU, A.; PRIFTIS, K. N. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 5, p. 265-271, 2009.

PATTURAJAN, M. et al. DeltaNp63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling. **Cancer Cell**, v. 1, n. 4, p. 369-379, 2002.

PIGNATELLI, D. et al. Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the rat adrenal cortex. **Endocr. Res.**, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2002.

PILON, C. et al. Inactivation of the p16 tumor suppressor gene in adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, n. 8, p. 2776-2779, 1999.

POPESKO, P., REJTOVÁ, V., HORAK, J. Rats, mouse and golden hamster. In: _____. **Colour atlas of the anatomy of small laboratory animals**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Book Company; 2002. Vol. 2. p.63.

RAO, A. J.; LONG, J. A.; RAMACHANDRAN, J. Effects of antiserum to adrenocorticotropin on adrenal growth and function. **Endocrinology**, v. 102, n. 2, p. 371-378, 1978.

RAY, A. et al. p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes. **Mol. Cell. Biol.**, v. 29, n. 4, p. 986-999, 2009.

REDDY, G. P. Cell cycle: regulatory events in G1-->S transition of mammalian cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 54, n. 4, p. 379-386, 1994.

RESNITZKY, D.; REED, S. I. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 7, p. 3463-3469, 1995.

SASANO, N.; KITAGAWA, I. Corticosteroid-induced atrophy of the human adrenals comparable to panhypopituitarism A histopathological study. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 83, n. 3, p. 270-281, 1964.

SCHIMMER, B. Cyclic nucleotides in hormonal regulation of adrenocortical function. **Advances in cyclic nucleotide research**, v. 13, p. 181-214, 1980.

SCHWINDT, T. T. et al. Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. **Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 2116-2121, 2003.

SEGER, M. A.; BENNETT, H. P. Structure and bioactivity of the amino-terminal fragment of pro-opiomelanocortin. **J. Steroid Biochem.**, v. 25, n. 5B, p. 703-710, 1986.

SEIDAH, N. G.; CHRÉTIEN, M. Complete amino acid sequence of a human pituitary glycopeptide: an important maturation product of pro-opiomelanocortin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 7, p. 4236-4240, 1981.

- SHEN, M. et al. Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 13618-13623, 1997.
- SHERR, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 551-555, 1994.
- SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes & Development**, v. 13, n. 12, p. 1501-1512, 1999.
- SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. **Genes & Development**, v. 18, n. 22, p. 2699-2711, 2004.
- SICINSKA, E. et al. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. **Cancer Cell**, v. 4, n. 6, p. 451-461, 2003.
- SICINSKI, P. et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. **Cell**, v. 82, n. 4, p. 621-630, 1995.
- SICINSKI, P. et al. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. **Nature**, v. 384, n. 6608, p. 470-474, 1996.
- SIMON, D. P.; HAMMER, G. D. Adrenocortical stem and progenitor cells: Implications for adrenocortical carcinoma. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 1, p. 2-11, 2012.
- SINGH, P.; COE, J.; HONG, W. A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. **Nature**, v. 374, n. 6522, p. 562-565, 1995.
- SOLVASON, N. et al. Cyclin d2 is essential for BCR-mediated proliferation and CD5 B cell development. **International Immunology**, v. 12, n. 5, p. 631-638, 2000.
- STRAUSS, M.; LUKAS, J.; BARTEK, J. Unrestricted cell cycling and cancer. **Nat. Med.**, v. 1, n. 12, p. 1245-1246, 1995.
- SUN, A. et al. From G0 to S phase: A view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, n. 6, p. 1400-1404, 2007.
- TCHEN, T. T. et al. Studies on the adrenal cortex of hypophysectomized rats: A model for abnormal cellular atrophy and death. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 79-87, 1977.
- THOMAS, M. et al. Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4320-4329, 2004.
- TISSIER, F. et al. Cyclin E correlates with malignancy and adverse prognosis in adrenocortical tumors. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 150, n. 6, p. 809-817, 2004.

TORRES, T. E.; DE MENDONÇA, P. O.; LOTFI, C. F. Synthetic modified N-POMC(1-28) controls in vivo proliferation and blocks apoptosis in rat adrenal cortex. **Cell Tissue Res.**, v. 341, n. 2, p. 239-250, 2010.

TORRES, T. E.; LOTFI, C. F. Distribution of cells expressing Jun and Fos proteins and synthesizing DNA in the adrenal cortex of hypophysectomized rats: regulation by ACTH and FGF2. **Cell Tissue Res.**, v. 329, n. 3, p. 443-455, 2007.

TORRES, T.E.P. **Análise da ação do ACTH e do peptídeo N-terminal da POMC na proliferação, morte celular e na expressão de proteínas e genes de resposta secundária na supra-renal de ratos hipofisectomizados ou tratados com dexametasona.** 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TSUNODA, N. et al. Nek2 as a novel molecular target for the treatment of breast carcinoma. **Cancer Science**, v. 100, n. 1, p. 111-116, 2009.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 291, n. 5, p. E965-E973, 2006.

USATEGUI, R. et al. Immunoreactive alpha-MSH and ACTH levels in rat plasma and pituitary. **Endocrinology**, v. 98, n. 1, p. 189-96, 1976.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

WATANABE, G. et al. Angiotensin II activation of cyclin D1-dependent kinase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 37, p. 22570-22577, 1996.

WATTS, A. G. Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: A complexity beyond negative feedback. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 26, n. 3-4, p. 109-130, 2005.

WENG, Z. et al. A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 21, p. 12334-12339, 1998.

WOOD, M. A.; HAMMER, G. D. Adrenocortical stem and progenitor cells: Unifying model of two proposed origins. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 336, n. 1-2, p. 206-212, 2011.

WU, W. et al. Alternative Splicing Controls Nuclear Translocation of the Cell Cycle-regulated Nek2 Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 36, p. 26431-26440, 2007.

XIONG, Y. et al. Human D-type cyclin. **Cell**, v. 65, n. 4, p. 691-699, 1991.

YOUNG, E.; CARLSON, N.; BROWN, M. Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 267-276, 2001.

ZHANG, P. et al. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Nature**, v. 387, n. 6629, p. 151-158, 1997.

ZINDY, F. et al. Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 182, n. 3, p. 1144-1154, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Artigo TORRES et al., 2010

TORRES, T.E.; DE MENDONCA, P.O., LOTFI, C.F. Synthetic modified N-POMC(1-28) controls in vivo proliferation and blocks apoptosis in rat adrenal cortex. **Cell and tissue research**. 341:239-250. 2010.

Synthetic modified N-POMC_{1–28} controls in vivo proliferation and blocks apoptosis in rat adrenal cortex

Thompson Eusebio Pavan Torres ·
Pedro Omori Ribeiro de Mendonça ·
Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

Received: 20 April 2010 / Accepted: 20 May 2010 / Published online: 29 June 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The identity of the pro-opiomelanocortin (POMC)-derived mitogen in the adrenal cortex has been historically controversial. We have used well-established in vivo models, viz., hypophysectomized (Hyp) or dexamethasone (Dex)-treated rats, to study the effect of the synthetic modified peptide N-terminal POMC (N-POMC_{1–28}) on DNA synthesis in the adrenal cortex, as assessed by BrdU incorporation and compared with adrenocorticotrophic hormone (ACTH). We evaluated the importance of disulfide bridges on proliferation by employing N-POMC_{1–28} without disulfide bridges and with methionines replacing cysteines. Acute administration of synthetic modified N-POMC_{1–28} distinctly increased DNA synthesis in the zona glomerulosa and zona fasciculata, but not in the zona reticularis in Hyp rats, whereas in Dex-treated rats, this peptide was effective in all adrenal zones. ACTH administration led to an increase of BrdU-positive cells in all adrenal zones irrespective of the depletion of Hyp or Dex-POMC peptides. The use of the ACTH antagonist, ACTH_{7–38}, confirmed the direct participation of ACTH in proliferation. Two different approaches to measure apopto-

sis revealed that both peptides similarly exerted a protective effect on all adrenocortical zones, blocking the apoptotic cell death induced by hypophysectomy. Thus, ACTH_{1–39} and N-POMC_{1–28} have similar actions suggesting that the disulfide bridges are important but not essential. Both peptides seem to be important factors determining adrenocortical cell survival throughout the adrenal cortex, reinforcing the idea that each zone can be renewed from within itself.

Keywords Adrenal cortex · Pro-opiomelanocortin · N-POMC_{1–28} · Proliferation · Apoptosis · Rat (Sprague Dawley, male)

Introduction

The maintenance of the normal structure and function of the adrenal cortex is dependent upon pro-opiomelanocortin (POMC) peptides produced by pituitary corticotrophs (Dallman 1984). Under this influence, the morphologically and functionally distinct cells comprising the three zones of the adult adrenal gland are constantly renewed, allowing for the size of each zone and its steroidogenic potential to be carefully regulated (Chester Jones 1957). All cells in the cortex are widely believed to be derived from the proliferation of progenitor cells resident in the outer periphery of the adrenal gland. Proliferation is followed by centripetal migration and phenotypic switching to produce functional zones before cells undergo apoptosis at the medullary boundary (Morley et al. 1996). Cell proliferation is known to depend upon peptides processed from the precursor POMC, since hypophysectomy or down-regulation of corticotroph activity using dexamethasone (Dex) results in adrenal atrophy (Bransome 1968).

The authors declare no conflicts of interest to prejudice the impartiality of the research reported.

T.E.P.T. and P.O.R.M. are recipients of scholarships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Foundation for the Support of Research in the State of São Paulo); C.F.P.L. received funding from FAPESP, from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, The National Council for Scientific and Technological Development), and from the Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (University of São Paulo Dean's Office for Research Projects).

T. E. P. Torres · P. O. R. de Mendonça · C. F. P. Lotfi (✉)
Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade de São Paulo,
São Paulo 05508-000, Brazil
e-mail: clotfi@usp.br

More recently, this has been confirmed by the targeted disruption of the POMC gene; this causes adrenal atrophy to occur just after birth (Karpac et al. 2005). The adrenocorticotrophic hormone (ACTH) is considered as the main mitogenic stimulus for the adrenal cortex because of the correlation between circulating levels of the former and the size of the latter (New 1998). In addition, some studies in animal models have shown that ACTH administration leads to adrenocortical cellular proliferation (Malendowicz et al. 1992; Pignatelli et al. 2002). On the other hand, other data have shown that ACTH shares the mitogenic drive for the adrenal glands with other peptides. The first experimental evidence for this came from work in rats in which circulating ACTH was neutralized by the infusion of anti-ACTH antibody; this resulted in a decrease in steroid levels and an increase in adrenal mitogenesis, suggesting that the lower steroid levels promoted the synthesis and release of POMC peptides differently from ACTH (Rao et al. 1978). These observations lead to the investigation of a role in adrenal cell proliferation for the N-terminal fragments of POMC, known as N-POMC (Estivariz et al. 1982; Lowry et al. 1983). Two shorter peptides purified from human pituitaries, namely N-POMC_{1–28} and N-POMC_{2–54} were found to be potent mitogens in vitro (Estivariz et al. 1982). Since neither of these peptides is a product of normal POMC processing, these mitogenic fragments were suggested to be generated by cleavage of pro- γ -melanocyte-stimulating hormone (Lowry et al. 1983). Later, Bicknell et al. (2001) identified the enzyme responsible for this cleavage, named adrenal secretory protease (AsP), and using AsP with synthetic and natural substrates, Bicknell (2003) concluded that the adrenal mitogen was N-POMC_{1–52}. More recently, the stimulation of a mitogenic signaling pathway by N-POMC_{1–28} and N-POMC_{1–49} in vitro has been described (Pepper and Bicknell 2009).

Previous findings from our laboratory have shown that ACTH administration in hypophysectomized (Hyp) or Dex-treated rats induces S-phase entry in all zones of the adrenal cortex, which confirms that the adrenocortical proliferative capacity is not restricted to the outer adrenal zone (Baccaro et al. 2007; Torres and Lotfi 2007). Moreover, these studies have implicated the AP-1 family of transcription factors in the regulation of the cell cycle during ACTH-induced proliferation in the adrenal cortex (Torres and Lotfi 2007). The aim of the present work has been to extend the study of the role of synthetic modified peptide N-POMC_{1–28} without disulfide bridges in the proliferation of the adrenal cortex by using two well-known in vivo models, viz., Hyp and Dex-treated rats. In addition, the capacity of these peptides to protect the adrenal cortex from atrophy induced by depletion of circulating POMC peptides has been analyzed. We have found that synthetic modified peptide N-POMC_{1–28} without disulfide bridges has a protective effect in all adrenal

gland zones comparable with the ACTH effect. Conversely, the mitogenic effect of the modified peptide is similar to that of ACTH_{1–39}, suggesting that the disulfide bridges might be important but are not essential.

Materials and methods

Animals

Male Sprague-Dawley rats, weighing 250±30 g, were obtained from the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo and maintained in a temperature-controlled environment on a 12-h light/dark cycle. The Animal Experimentation Ethics Committee of the Biomedical Sciences Institute approved all protocols. All animals had free access to tap water and normal rat chow. All experiments were conducted between 9:00 am and 11:00 am. At the indicated time, rats were killed by decapitation, and the adrenal glands were harvested. At the time of sacrifice, blood samples were collected, and circulating plasma ACTH was measured by an immunochemiluminescent assay (Immulite; Diagnostic Products, Los Angeles, Calif., USA).

Hypophysectomy

Animals were anesthetized by using intraperitoneal injections of ketamine (5 mg/100 g body weight [BW]), acepromazine (0.2 mg/100 g BW) and xylazine (1 mg/100 g BW). The rats were hypophysectomized by the parapharyngeal approach, as described in Waynforth and Flecknell (1992), or were sham-operated. After decapitation, the hypophyseal fossae of ostensibly Hyp rats were visually inspected for the completeness of hypophysectomy. Only those rats deemed hypophysectomized (by visual inspection) and presenting low plasma ACTH levels were included in subsequent experiments.

N-POMC peptide synthesis

The rat N-POMC_{1–28} peptide (Tryptophan; Methionine₂; Leucine; Glutamic acid; Serine; Serine; Glutamine; Methionine₈; Glutamine; Aspartic acid; Leucine; Threonine; Threonine; Glutamic acid; Serine; Asparagine; Leucine; Leucine; Alanine; Methionine₂₀; Isoleucine; Arginine; Alanine; Methionine₂₄; Arginine; Leucine; Aspartic acid; Leucine-NH₂) was synthesized by the Department of Biochemistry and Biophysics of the Federal University of São Paulo (UNIFESP). To avoid undefined disulfide bonds, the peptide was synthesized with the replacement of cysteine 2, 8, 20, and 24 residues by methionine. At least two different synthetic reactions were performed for the same peptide sequence.

In vivo treatment and BrdU incorporation

At 72 h after the surgical procedure, animals were divided into one group of sham-operated rats (Sham) and eight groups of Hyp rats, each containing four or five animals, all of which received single intraperitoneal injections of one of the following: 0.9% saline solution (Hyp); 10^{-7} M ACTH₁₋₃₉; 10^{-7} M N-POMC₁₋₂₈; 10^{-9} M N-POMC₁₋₂₈; 10^{-7} M ACTH₇₋₃₈ (an antagonist of ACTH₁₋₃₉); or 10^{-5} M ACTH₇₋₃₈. At 15 min after the initial injections, all animals received an intraperitoneal injection of 10^{-7} M ACTH₁₋₃₉, and then at 12 h after the initial injections, a single intraperitoneal injection of 100 µg BrdU (Sigma, St. Louis, Mo., USA) per 100 g BW. At 24 h after the initial injections, the rats were weighed and killed by decapitation. Adrenal glands were removed, fixed for 8–12 h in 10% formaldehyde, and embedded in paraffin. Sections were cut on a microtome and, after being deparaffinized, were rehydrated. Endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% hydrogen peroxide in methanol. The sections were hydrolyzed with 1.5 N HCl and then incubated with monoclonal anti-mouse-BrdU antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The immune complexes were detected by immunoperoxidase staining with the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA) and diaminobenzidine (Sigma Fast; Sigma Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Adrenal sections incubated in primary antibody pre-absorbed with 100 mg/ml BrdU or in non-immune primary sera tested negative (not shown). Jejunal sections were used as positive controls.

Dex treatment

Dex (Achê Laboratórios Farmacêuticos, Campinas, SP, Brazil) treatment was performed as described in Baccaro et al. (2007). Briefly, male Sprague-Dawley rats were divided into five groups ($n=4-5$): Dex+, Dex+ACTH₁₋₃₉, Dex+N-POMC₁₋₂₈, Dex+ACTH₁₋₃₉+N-POMC₁₋₂₈, and control (Dex-). Dex was administered intraperitoneally at a dose of 50 mg/100 g BW once a day at 9:00 am for 2 days (Dex+). Control rats received identical injections of saline

only (Dex-). At 12 h after the initial injections, all animals received single injections of 100 µg/100 g BW BrdU (Sigma) and were processed as described above.

Fig. 1 Effect of ACTH₁₋₃₉, ACTH₇₋₃₈, and the combination of 10^{-5} M ACTH₇₋₃₈ + 10^{-7} M ACTH₁₋₃₉ on the percentage of BrdU-positive nuclei in the adrenal cortex of hypophysectomized (Hyp) rats. Values given are the number of BrdU-positive nuclei expressed as a percentage of the total number of nuclei. The differences between values for BrdU incorporation in sham-operated (Sham) versus Hyp (#); Hyp versus treated rats (*), Hyp versus ACTH₇₋₃₈ (&), and 10^{-7} M ACTH₁₋₃₉ versus 10^{-5} M ACTH₇₋₃₈ + 10^{-7} M ACTH₁₋₃₉ (†) were analyzed by ANOVA and the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$

In vivo assay for apoptosis detection in Hyp rats

At 24 h after the surgical procedure, animals were divided into one group of sham-operated rats (Sham) and four groups of Hyp rats, all of which received single intraperitoneal injections of one of the following: 0.9% saline (Hyp), 10^{-7} M ACTH_{1–39}, 10^{-9} M ACTH_{1–39}, or 10^{-7} M N-POMC_{1–28}. Each experimental group contained four or five rats. At 24 h after the administration of peptides, the adrenal glands were removed, fixed for 8–12 h in 10% formaldehyde, and embedded in paraffin. Sections were cut on a microtome and, after being deparaffinized, were rehydrated. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide in methanol. Following antigen retrieval by heating the samples in a microwave oven (100 W) with citric acid (pH 6), the slides were incubated in a solution containing phosphate-buffered saline (PBS), 1% bovine serum albumin (Sigma), and 0.1% Tween 20 (Amresco, Solon, Ohio, USA). After being washed, slides were incubated for 1 h in the dark with the M30 monoclonal antibody at 1:100 in PBS (M30-Cytodeath; Roche Labs, Germany). Immune complexes were detected by immunoperoxidase staining with the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA) and diaminobenzidine (Sigma Fast; Sigma Aldrich). The sections were washed and stained with hematoxylin, differentiated with a saturated solution of lithium carbonate, dehydrated, and mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Negative controls were performed by omission of the M30 antibody.

Immunofluorescence for the TUNEL reaction

The In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim, Germany) was used following the protocol reported by Gavrieli et al. (1992) for TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling). Briefly, the sections were deparaffinized, rehydrated, digested with 15 µg/ml proteinase K (Sigma), immersed in TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) buffer containing TdT and fluorescein-isothiocyanate-dUTP, and incubated in a dark and humid atmosphere for 1 h. After being washed, the sections were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), dehydrated, and mounted. As a positive control, we used sections from rat mammary glands. For negative controls, TdT was omitted from the reaction mixture.

Immunoreactive cell counts

The effects of the various treatments on the adrenal cortex were quantified by counting the number of immunostained cortical cells per unit area of the cortex. Four to five animals were used in each treatment. For the quantification of BrdU incorporation, 15 areas (with 90–100 nuclei/area) from each section were sampled randomly in the three zones of the adrenal cortex identified on the basis of their morphology and examined with a 40× objective attached to a Nikon microscope equipped with a video camera and NIS-Elements D. Images were digitalized by using Image-

Fig. 2 Distribution of BrdU-labeled cells in the rat adrenal cortex of (a) Hyp rat, (b) Hyp rat + ACTH_{1–39} (10^{-7} M), (c) Hyp rat + ACTH_{7–38} (10^{-5} M) + ACTH_{1–39} (10^{-7} M), (d) Hyp rat + N-POMC (10^{-7} M). BrdU (100 µg/100 g BW) was injected (i.p.) 12 h before rats were killed (brown BrdU incorporation into nuclei of S phase cells, ZG zona glomerulosa, ZF zona fasciculata, ZR zona reticularis). Sections were stained with Harris' hematoxylin and differentiated with a saturated solution of lithium carbonate. Bars 100 µm

Pro Plus version 4.1 for Windows, and all immunoreactive nuclear profiles, regardless of the intensity of the immunostaining, were counted. For each zone of each adrenal

Fig. 3 Effect of synthetic N-POMC₁₋₂₈ on the percentage of BrdU-positive nuclei in the adrenal cortex of hypophysectomized (*Hyp*) rats. Values given are the number of BrdU-positive nuclei expressed as a percentage of the total number of nuclei. The differences between values for BrdU incorporation in sham-operated (*Sham*) versus *Hyp* (#) and *Hyp* versus treated rats (*) were analyzed by using ANOVA and the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. ****P*<0.001, ***P*<0.01, **P*<0.05

Fig. 4 Effect of N-POMC₁₋₂₈ on the percentage of BrdU-positive nuclei in the adrenal cortex of dexamethasone (*Dex*) treated rats. Values given are the number of BrdU-positive nuclei expressed as a percentage of the total number of nuclei. The differences between values for BrdU incorporation in *Dex* versus treated rats (*) and *Dex* versus 10⁻⁷M ACTH₁₋₃₉ + 10⁻⁷M N-POMC₁₋₂₈ (†) were analyzed by using ANOVA and the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. ****P*<0.001, ***P*<0.01, **P*<0.05

gland, the BrdU index, defined as the number of BrdU-positive nuclei and expressed as a percentage of the total number of nuclei, was determined. Together with the BrdU

index, the morphology of the labeled cells was considered, as BrdU incorporation has also been seen in apoptosis.

For the quantification of the M30 and TUNEL reactions, 30 areas from each section were sampled randomly in the three zones of the adrenal cortex and examined with a 100× objective. The M30 images were digitalized by using the same equipment and image program as described above, and the number of M30-positive cells was determined. For analysis and quantification of apoptosis by TUNEL staining, the count considered TUNEL-labeled versus DAPI-stained cells visualized in a fluorescence microscope.

Statistical analysis

Data obtained from each zone were averaged for each experimental group, and the standard error of the mean was calculated. After an analysis of variance (ANOVA),

statistical comparisons were made by using the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

ACTH_{1–39} induction of S-phase entry in adrenal cortex of Hyp rats is a direct effect on the inner zone

In previous work (Torres and Lotfi 2007), confirmed here, we described distinct effects of hypophysectomy in various zones of the adrenal cortex and showed that 10^{-7} M ACTH administration in Hyp rats induced S-phase entry in all zones: zona glomerulosa (ZG), 1.5-fold increase; zona fasciculata (ZF), 3.3-fold increase; zona reticularis (ZR), 3.0-fold increase. In order to determine whether the changes in DNA synthesis in the adrenal cortex observed

Fig. 5 Distribution of BrdU-labeled cells in the adrenal cortex of animals treated for 2 days with (a) Dex (50 µg/100 g BW), (b) Dex + ACTH (10^{-7} M), (c) Dex + N-POMC (10^{-7} M), (d) Dex + ACTH (10^{-7} M) + N-POMC (10^{-7} M), (e) negative control without primary antibody (ZG zona glomerulosa, ZF zona fasciculata, ZR zona reticularis, M medulla). BrdU (100 µg/100 g BW) was injected (i.p.) 12 h before animals were killed (brown BrdU incorporated into nuclei in S-phase cells). Sections were also stained with Harris' hematoxylin and differentiated with a saturated solution of lithium carbonate. Bars 100 µm

after ACTH administration in Hyp rats were attributable exclusively to ACTH_{1–39}, we employed ACTH_{7–38}, a selective antagonist for the ACTH receptor (ACTH-R). We found that 10^{-7} M ACTH_{7–38} alone did not significantly alter the numbers of BrdU-positive nuclei in the ZF and the ZR (Fig. 1b, c) in relation to Hyp rats. On the other hand, no increase in the number of BrdU-positive nuclei after surgery was observed in the ZG after ACTH_{7–38} administration (Fig. 1a), demonstrating an unselective effect of the ACTH-R antagonist in this zone. When 10^{-5} M ACTH_{7–38} and 10^{-7} M ACTH_{1–39} were administered to Hyp rats, by using the protocol described above, no increase was observed in the number of BrdU-positive nuclei after ACTH_{1–39} alone, in the ZF and ZR (Figs. 1, 2). These results indicated that proliferation was induced through the ACTH-R and as a direct effect of ACTH_{1–39} in the ZF and ZR.

Administration of synthetic modified N-POMC_{1–28} in rats hypophysectomized or treated with Dex induces S-phase entry in adrenal cortex

In Hyp rats treated with 10^{-9} M or 10^{-7} M N-POMC_{1–28}, the percentage of BrdU-positive cell nuclei was significantly greater ($P<0.05$) than that observed for Hyp rats (Figs. 2, 3). Increases of 1.5-fold and 1.3-fold, respectively, were seen in the ZG with 10^{-9} M and 10^{-7} M N-POMC (Fig. 3a) and increases of 2.2-fold with both concentrations in the ZF (Fig. 3b). In the ZR, no change was seen in the number of BrdU-positive nuclei after N-POMC administration, irrespective of the concentration used (Fig. 3c). Therefore, in contrast to ACTH, the N-POMC effect altered the number of BrdU-positive nuclei in the ZG and ZF of the adrenal cortex but not in the ZR. In work by Baccaro and collaborators (2007), and confirmed here, we showed that administration of 10^{-7} M ACTH in rats previously treated for 2 days with Dex produced a significant increase in the number of BrdU-positive nuclei in all adrenal zones (Figs. 4, 5). By contrast with the findings obtained in Hyp rats treated with N-POMC, only the 10^{-7} M concentration increased the number of BrdU-positive nuclei in adrenal zones (Fig. 5). Moreover, the percentage of BrdU-positive nuclei was similar with 10^{-7} M ACTH and 10^{-7} M N-POMC treatments in the ZG (respectively, 64.6% and 63%) and ZF (respectively, 49.4% and 42.4%), but not in the ZR. ACTH was more effective than N-POMC in increasing DNA synthesis in the ZR (respectively, 40% and 21%). Moreover, in the ZR, Dex treatment blocked the BrdU incorporation observed in control rats, and this was recovered by ACTH and N-POMC treatment.

The combination ACTH+N-POMC (Figs. 4, 5d) showed distinct effects on the different adrenal zones. We recorded a significant increase in BrdU-positive nuclei in the ZG, no

significant effect in the ZF and a significant decrease in the number of BrdU-positive nuclei in the ZR, in relation to ACTH and N-POMC alone.

Fig. 6 Effect of ACTH_{1–39} on the percentage of M30-positive cells in the adrenal cortex of hypophysectomized (*Hyp*) rats. Values given are the number of M30-positive cells expressed as a percentage of the total number of cells. The differences between values for M30-positive cells in sham-operated (*Sham*) versus *Hyp* (#) and *Hyp* versus treated rats (*) were analyzed by using ANOVA and the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$

Both ACTH_{1–39} and synthetic modified POMC_{1–28} administration blocked apoptosis *in vivo* in all adrenocortical zones of Hyp rats

Previous observations showed atrophy of the ZF and ZR and the inhibition of S-phase entry in the ZF of the adrenal cortex of Hyp rats (Torres and Lotfi 2007). Here, we investigated whether the inhibition of S-phase entry in all zones of the adrenal cortex was accompanied by an increase in the number of cells undergoing apoptosis. We used the M30-Cytodeath antibody, which determines early apoptotic events in cells and tissue sections by detection of a specific epitope of cytokeratin 18 that is present after cleavage by caspases. As seen in Figs. 6, 7a, we found that, after pituitary surgery, the numbers of M30-labeled cells were significantly higher than those in sham-operated animals in all zones of the adrenal cortex (ZG, 1.5– to 4.0-fold

increase; ZF, 3.0– to 6.0-fold increase; ZR, 2.5– to 3.3-fold increase), albeit to different degrees. Both 10^{−9}M ACTH and 10^{−7}M ACTH significantly reduced the number of M30-labeled cells in all zones of the adrenal cortex (ZG, 2.6- and 3.4- fold; ZF, 3.6- and 6.3- fold; ZR, 3.3- and 3.7-fold) of Hyp rats (Figs. 6, 7c). Similarly, 10^{−9}M N-POMC also decreased the number of M30-labeled cells in all adrenocortical zones of Hyp rats (ZG, 2.6-fold; ZF, 5.0-fold; ZR, 2.6-fold; Figs. 7d, 8). Indeed, in Hyp rats, physiological concentrations of both ACTH_{1–39} (Fig. 7c) and synthetic N-POMC_{1–28} (Fig. 7d) prevented the hypophysectomy-induced apoptosis in all adrenal cortex zones. We also observed an increase of M30-labeled cells in all adrenal cortex vasculature of Hyp rats (Fig. 7a, e, f) supporting the concept that ACTH controls the action of vascular endothelial growth factor on endothelial cells (Thomas et al. 2003).

Fig. 7 a–d Distribution of M30-labeled cells in the adrenal cortex of (a) Hyp rat (ZG zona glomerulosa, ZF zona fasciculata, ZR zona reticularis), (b) negative control, (c) Hyp + 10^{−7}M ACTH_{1–37}, (d) Hyp + 10^{−7}M N-POMC_{1–28}. **e** ZF cytoplasm labeled in Hyp rat (arrow M30-positive cell cytoplasm). **f** ZR cytoplasm labeled in Hyp rat (arrows M30-positive cell cytoplasm, arrowheads M30-positive vasculature). Sections were stained with Harris' hematoxylin and differentiated with a saturated solution of lithium carbonate. Bars 100 μ m (a–d), 10 μ m (e, f)

Fig. 8 Effect of N-POMC_{1–28} on the percentage of M30-positive cells in the adrenal cortex of hypophysectomized (*Hyp*) rats. Values given are the number of M30-positive cells expressed as a percentage of the total number of cells. The differences between values for M30-positive cells in sham-operated (*Sham*) versus *Hyp* ([#]) and *Hyp* versus treated rats (^{*}) were analyzed by using ANOVA and the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. ^{***}*P*<0.001, ^{**}*P*<0.01, ^{*}*P*<0.05

DNA fragmentation event correlates with early apoptotic events and is blocked by ACTH_{1–39}

In order to detect a late event in apoptosis, viz., DNA fragmentation, the adrenal cortex of *Hyp* rats was examined

by using an In Situ Cell Death Detection Kit. This reaction allows the apoptotic figure to be visualized by TUNEL assay. Irrespective of the adrenocortical zone examined, the percentage of TUNEL-positive cells (Figs. 9, 10) was lower than that of M30-labeled cells (Figs. 6, 7). This difference can be explained as, by this stage of the apoptotic process,

Fig. 9 Effect of ACTH_{1–39} on the percentage of TUNEL-positive cells in (a) zona glomerulosa, (b) zona fasciculata, (c) zona reticularis of the adrenal cortex. Values given are the number of TUNEL-positive cells expressed as a percentage of the total number of cells. The differences between values for TUNEL-positive cells in sham-operated (*Sham*) versus hypophysectomized (*Hyp*, [#]) and *Hyp* versus treated rats (^{*}) were analyzed by using ANOVA and the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. ^{***}*P*<0.001, ^{**}*P*<0.01, ^{*}*P*<0.05

Fig. 10 Detection of TUNEL-positive cells in the adrenal cortex. **a** DAPI-labeled cells (*blue*). **b** TUNEL-positive cells (*arrows*). **c** Merged image. *Bar* 50 μ m

an efficient phagocytic removal of the apoptotic bodies has occurred, which makes the detection of apoptosis difficult. However, as seen with early apoptotic events, DNA fragmentation was observed in all zones of Hyp rats (ZG 2.0-fold and ZF and ZR 1.7-fold increase over controls). Furthermore, 10^{-7} M ACTH was also effective in preventing apoptosis, since it decreased the number of cells exhibiting DNA fragmentation (ZG 2.3-fold and ZF and ZR 2.6-fold decrease compared with Hyp) in all zones of the adrenal cortex.

Discussion

ACTH is one among many regulators of adult adrenal gland functions. However, ACTH is also considered mitogenic because, in clinical and animal studies, circulating ACTH levels are positively correlated to the size of the adrenals (New 1998), and because chronic ACTH secretion induces bilateral hyperplasia of the adrenals (Bland et al. 2003). A considerable amount of evidence indicates that the outer region of the adrenal cortex (capsule, subcapsular cells, and ZG) is the primary site of cell proliferation, supported by many agents, but particularly by angiotensin II and ACTH, and this zone is thought to present a high degree of complexity (Vinson 2004). In addition, an undifferentiated zone between the ZG and ZF has been proposed to be the proliferative/stem cell zone (Mitani et al. 1994). Conversely, evidence is also available that each zone can be renewed from within itself. Although proliferation is more frequent in the subcapsular/glomerulosa cell zone, it is not restricted to this region, since cell proliferation also occurs in the ZF and ZR (McEwan et al. 1999; Baccaro et al. 2007; Torres and Lotfi 2007). Additionally, there is evidence that POMC-derived peptides other than ACTH play a role in the control of adrenal growth. Some studies have suggested that a potent adrenal mitogenic peptide resides within N-POMC (Estivariz et al. 1982, 1988; Lowry et al. 1983; Fassnacht et al. 2003), and the description of a serine

protease that specifically cleaves N-POMC to generate a mitogenic peptide in the adrenals has been important in supporting this hypothesis. However, earlier studies investigating the mitogenic activity of N-POMC were based on the use of pituitary extracts possibly contaminated by unknown peptides (Estivariz et al. 1982) or on the use of synthetic peptides with undefined disulfide bonds (Bennett et al. 1986). Later, the arrangement of disulfide bridges was determined (Seeger and Bennett 1986) and appeared to be important for N-POMC biological activity (Denef et al. 2001; Loh et al. 2002). The present study has been designed to determine which adrenocortical zones exhibit proliferation on acute treatment involving synthetic modified N-POMC_{1–28} without disulfide bridges and with cysteines replaced by methionines, with a view to avoiding undefined disulfide bonds. We have used well-known models to analyze ACTH and synthetic N-POMC_{1–28} control of adrenocortical cell proliferation accompanied by the 12-h incorporation of BrdU. In addition, we have examined the capacity of ACTH and N-POMC_{1–28} to block apoptosis promoted by reduced levels of POMC peptides in plasma. Our results show that, in rats depleted of circulating POMC peptides, the administration of both ACTH_{1–39} and synthetic modified N-POMC_{1–28} results in the induction of cell proliferation in the adrenal cortex. Irrespective of experimental condition, the number of BrdU-positive nuclei in the ZG is comparatively large, after either ACTH or N-POMC treatment. The capacity to respond to these peptides is higher in the inner zones of adult rat adrenal cortex, except that the combination of ACTH and N-POMC is necessary. The distribution of BrdU in the ZG after treatment with a combination of ACTH and N-POMC is of considerable interest in view of the known importance of this area of the gland as a primary site for cell proliferation and renewal in the adrenal cortex (Wright 1971; Payet et al. 1980; Zajicek et al. 1986). Our data support the idea that, after POMC peptide stimulation, all the adult adrenal cortex has the potential to proliferate, and thus this capacity is not confined to the outer region (capsule, subcapsular cells, and

ZG). This is consistent with the view that, although cell division in the ZG has an important role in the maintenance of the adult structure of rat adrenal cortex, the inner zones are no less important. Our findings do not suggest a special function for the intermediate zone in proliferation as observed in Wistar rats by McNeill and collaborators (2005). The effect of the administration of ACTH_{7–38}, a useful tool that allows discrimination between ACTH-dependent and ACTH-independent biological effects, suggests that ACTH_{1–39} directly stimulates proliferation in the ZF and ZR. This result does not support the hypothesis that ACTH has an indirect mitogenic effect in vivo (Hornsby 1984). Conversely, in the ZG, the ACTH antagonist is not selective. Corticotropin-inhibiting peptide is identical to fragment 7–38 of ACTH_{1–39} and has been shown markedly to raise basal aldosterone secretion from a fresh suspension of rat ZG cells, involving the activation of angiotensin II receptors (Malendowicz et al. 1998). Hence, this side-effect of the ACTH antagonist must be taken into account in interpreting the results for proliferation in the ZG after administration of the ACTH antagonist. Moreover, this reinforces the notion that the increase in proliferation in the ZG is dependent on paracrine/autocrine factors and is relatively independent of POMC peptides (Vinson 2003).

Peripheral delivery of purified POMC_{1–28} to intact rats partially prevents the atrophy of regenerating adrenal glands after hypophysectomy (Estivariz et al. 1988). Furthermore, human N-POMC fragment 1–28 with the disulfide bridges in the correct position between cysteine residues 2–24 and 8–20 stimulates cell proliferation in vitro in a concentration-dependent manner (Fassnacht et al. 2003). However, peripheral administration of this peptide in POMC^{−/−} mice reduces food intake and body weight but does not affect adrenal growth (Coll et al. 2006). Our results show that the administration of N-POMC_{1–28} with methionine substituting for cysteine, and thus without the disulfide bridges, stimulates S-phase entry in the adrenal cortex; these data are compatible with our in vitro results showing that the synthetic modified N-POMC_{1–28} phosphorylates mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase and induces proliferation in rat primary adrenal cell culture (results not shown). This contrasts with the findings of earlier investigations showing the disulfide bridge arrangement of native N-POMC as being crucial for its biological activity (Bennett et al. 1986; Seger and Bennett 1986; Denef et al. 2001). Nevertheless, the proliferative effect of modified N-POMC_{1–28} administration in Hyp rats is less efficient than that of ACTH in terms of the percentage of BrdU-positive cell nuclei. Thus, our study supports the concept that, at least in part, the mitogenic stimulus for the adrenal cortex resides in the N-terminus of POMC. In addition, the effect observed occurs without the disulfide bridges between cysteine residues,

although the mechanism of this is unclear and warrants further investigation.

In agreement with earlier reports (Wyllie et al. 1973; Zajicek et al. 1986; Tilly and Hsueh 1993), we have found that hypophysectomy induces characteristic apoptotic cell labeling within 2 days. This contrasts with the observations of Carsia and collaborators (1996, 1998) who report that hypophysectomy-induced apoptosis in the rat adrenal gland is not restricted to a subpopulation of cells in the ZR. Two different approaches to quantifying labeled apoptotic cells have demonstrated here that the whole of the adrenal cortex shows a similar increase in apoptotic cells after pituitary surgery. In addition, the evidence for the remodeling of the vasculature after hypophysectomy reinforces the observation that POMC peptides are also required for the maintenance of adult cortical vasculature (Thomas et al. 2003). Finally, in contrast to the results of short-term adrenal culture (Carsia et al. 1996), the susceptibility of the ZG to triggered cell death is similar to that of other regions. The anti-apoptotic action of ACTH is expected, but the efficiency of the synthetic N-POMC_{1–28} is noteworthy. Indeed, both peptides separately abolish the apoptosis triggered by hypophysectomy, returning apoptotic levels to those of sham-operated rats. Experiments with synthetic modified N-POMC are currently underway in vivo and in vitro to elucidate the molecular mechanisms underlying adrenocortical cell maintenance and the manner in which these mechanisms are regulated.

Acknowledgements We are grateful to Dr. Maria Aparecida Juliano from the Department of Biochemistry and Biophysics of the Federal University of São Paulo (UNIFESP) for the synthesis of N-POMC peptides and to Dr. Marina Baquerizo Martinez for technical assistance with measurements of the circulating plasma ACTH.

References

- Baccaro RB, Mendonca PO, Torres TE, Lotfi CF (2007) Immunohistochemical Jun/Fos protein localization and DNA synthesis in rat adrenal cortex after treatment with ACTH or FGF2. *Cell Tissue Res* 328:7–18
- Bennett HP, Seidah NG, Benjannet S, Solomon S, Chretien M (1986) Reinvestigation of the disulfide bridge arrangement in human pro-opiomelanocortin N-terminal segment (hNT 1–76). *Int J Pept Protein Res* 27:306–313
- Bicknell AB (2003) Identification of a serine protease involved with the regulation of adrenal growth. *Ann N Y Acad Sci* 994:118–122
- Bicknell AB, Lomthaisong K, Woods RJ, Hutchinson EG, Bennett HP, Gladwell RT, Lowry PJ (2001) Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. *Cell* 105:903–912
- Bland ML, Desclozeaux M, Ingraham HA (2003) Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann N Y Acad Sci* 995:59–72
- Bransome ED Jr (1968) Regulation of adrenal growth. Differences in the effects of ACTH in normal and dexamethasone-suppressed guinea pigs. *Endocrinology* 83:956–964

- Carsia RV, Macdonald GJ, Gibney JA, Tilly KI, Tilly JL (1996) Apoptotic cell death in the rat adrenal gland: an in vivo and in vitro investigation. *Cell Tissue Res* 283:247–254
- Carsia RV, Nagele RG, Morita Y, Tilly KI, Tilly JL (1998) Models to elucidate the regulation of adrenal cell death. *Endocr Res* 24:899–908
- Chester Jones I (1957) The adrenal cortex. Cambridge University Press, Cambridge
- Coll AP, Fassnacht M, Klammer S, Hahner S, Schulte DM (2006) Peripheral administration of the N-terminal pro-opiomelanocortin fragment 1–28 to *Pomc*^{-/-} mice reduces food intake and weight but does not affect adrenal growth or corticosterone production. *J Endocrinol* 190:515–525
- Dallman MF (1984) Control of adrenocortical growth in vivo. *Endocr Res* 10:213–242
- Denef C, Roudbaraki M, Van Bael A (2001) Growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain of pro-opiomelanocortin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:239–243
- Estivariz FE, Iturriza F, McLean C, Hope J, Lowry PJ (1982) Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides. *Nature* 297:419–422
- Estivariz FE, Carino M, Lowry PJ, Jackson S (1988) Further evidence that N-terminal pro-opiomelanocortin peptides are involved in adrenal mitogenesis. *J Endocrinol* 116:201–206
- Fassnacht M, Hahner S, Hansen IA, Kreutzberger T, Zink M, Adermann K, Jakob F, Troppmair J, Allolio B (2003) N-terminal proopiomelanocortin acts as a mitogen in adrenocortical tumor cells and decreases adrenal steroidogenesis. *J Clin Endocr Metab* 88:2171–2179
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493–501
- Hornsby PJ (1984) Regulation of adrenocortical cell proliferation in culture. *Endocr Res* 10:259–281
- Karpac J, Ostwald D, Bui S, Hunnewell P, Shankar M, Hochgeschwender U (2005) Development, maintenance, and function of the adrenal gland in early postnatal proopiomelanocortin-null mutant mice. *Endocrinology* 146:2555–2562
- Loh YP, Maldonado A, Zhang C, Tam WH, Cawley N (2002) Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. *Ann N Y Acad Sci* 971:416–425
- Lowry PJ, Silas L, McLean C, Linton EA, Estivariz FE (1983) Progamma-melanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth. *Nature* 306:70–73
- Malendowicz LK, Nussdorfer GG, Markowska A, Nowak KW (1992) Analysis of the preventive action of ACTH on dexamethasone-induced adrenocortical atrophy in the rat. *Cytobios* 71:191–199
- Malendowicz LK, Rebuffat P, Nussdorfer GG, Nowak KW (1998) Corticotropin-inhibiting peptide enhances aldosterone secretion by dispersed rat zona glomerulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:149–152
- Mitani F, Suzuki H, Hata J, Ogishima T, Shimada H, Ishimura Y (1994) A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. *Endocrinology* 135:431–438
- McEwan PE, Vinson GP, Kenyon CJ (1999) Control of adrenal cell proliferation by AT1 receptors in response to angiotensin II and low-sodium diet. *Am J Physiol* 276:E303–E309
- McNeill H, Whitworth E, Vinson GP, Hinson JP (2005) Distribution of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in the rat adrenal and their activation by angiotensin II. *J Endocrinol* 187:149–157
- Morley SD, Viard I, Chung BC, Ikeda Y, Parker KL, Mullins JJ (1996) Variegated expression of a mouse steroid 21-hydroxylase/beta-galactosidase transgene suggests centripetal migration of adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* 10:585–598
- New MI (1998) Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Annu Rev Med* 49:311–328
- Payet N, Lehoux JG, Isler H (1980) Effect of ACTH on the proliferative and secretory activities of the adrenal glomerulosa. *Acta Endocrinol (Copenh)* 93:365–374
- Pepper DJ, Bicknell AB (2009) The stimulation of mitogenic signaling pathways by N-POMC peptides. *Mol Cell Endocrinol* 300:77–82
- Pignatelli D, Ferreira J, Vendeira P, Magalhaes MC, Vinson GP (2002) Proliferation of capsular stem cells induced by ACTH in the rat adrenal cortex. *Endocr Res* 28:683–691
- Rao AJ, Long JA, Ramachandran J (1978) Effects of antiserum to adrenocorticotropin on adrenal growth and function. *Endocrinology* 102:371–378
- Seger MA, Bennett HP (1986) Structure and bioactivity of the amino-terminal fragment of pro-opiomelanocortin. *J Steroid Biochem* 25:703–710
- Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ (2003) Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature. *Microsc Res Tech* 61:247–251
- Tilly JL, Hsueh AJ (1993) Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. *J Cell Physiol* 154:519–526
- Torres TE, Lotfi CF (2007) Distribution of cells expressing Jun and Fos proteins and synthesizing DNA in the adrenal cortex of hypophysectomized rats: regulation by ACTH and FGF2. *Cell Tissue Res* 329:443–455
- Vinson GP (2003) Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc Res Tech* 61:227–239
- Vinson GP (2004) Glomerulosa function and aldosterone synthesis in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 217:59–65
- Waynforth H, Flecknell P (1992) Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press, London
- Wright NA (1971) Variation in tritiated thymidine uptake during DNA synthesis in the adrenal cortex. *Histochemie* 28:99–102
- Wyllie AH, Kerr JF, Macaskill IA, Currie AR (1973) Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. *J Pathol* 111:85–94
- Zajicek G, Ariel I, Arber N (1986) The streaming adrenal cortex: direct evidence of centripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate. *J Endocrinol* 111:477–482

APÊNDICE B - Artigo MENDONCA; LOTFI, 2011

MENDONCA, P.O.R.; LOTFI, C.F.P. The proliferative effect of synthetic N-POMC (1-28) peptides in rat adrenal cortex: a possible role for cyclin E. **Mol. and Cell. Endo.** 336(1-2):156-161. 2011.

The proliferative effect of synthetic N-POMC_{1–28} peptides in rat adrenal cortex: A possible role for cyclin E

Pedro O.R. de Mendonça, Claudimara F.P. Lotfi*

Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, São Paulo 05508-000, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 August 2010

Received in revised form 7 December 2010

Accepted 7 December 2010

Keywords:

Adrenal cortex

N-POMC_{1–28}

ACTH

Proliferation

Cyclin E

ABSTRACT

Modified synthetic N-POMC_{1–28} without disulfide bridges has been shown to act as an adrenal mitogen. Cyclins and their inhibitors are the major cell cycle controls, but in the adrenal cortex the effect of ACTH and N-POMC on the expression of these proteins remains unclear. In this work, we evaluate the effect of different synthetic N-POMC peptides on the S-phase of the cell cycle. In addition, we examine the cyclin E expression in rat adrenal cortex. Rats treated with dexamethasone were injected with ACTH and/or synthetic modified N-POMC and/or synthetic N-POMC with disulfide bridges. DNA synthesis was determined by BrdU incorporation and protein expression was analyzed by immunoblotting and immunohistochemistry. The results showed that similarly to modified N-POMC without disulfide bridges, administration of synthetic N-POMC with disulfide bridges and the combination of ACTH and N-POMC promoted an increase of BrdU-positive nuclei in adrenal cortex. However, the proliferative effect of N-POMC was comparable to that of ACTH only in the zona glomerulosa. An increase in cyclin E expression was observed 6 h after N-POMC treatment in the outer fraction of the adrenal cortex, in agreement with immunohistochemical findings in the zona glomerulosa. In summary, the effect of synthetic N-POMC with disulfide bridges was similar to modified synthetic N-POMC, increasing proliferation in the adrenal cortex, confirming previous evidence that disulfide bridges are not essential to the N-POMC mitogenic effect. Moreover, cyclin E appears to be involved in the N-POMC- and ACTH-stimulated proliferation in the zona glomerulosa of the adrenal cortex.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Among pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides, the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) is considered one of the main mitogenic stimuli for the adrenal cortex (New, 1998). However, other POMC peptides different from ACTH seem also appear to have a role in adrenal cell proliferation. The N-terminal fragments of POMC, known as N-POMC, have been shown to stimulate adrenal cell proliferation (Estivariz et al., 1982; Lowry et al., 1983). N-POMC_{1–28} and N-POMC_{2–54} peptides were found to be potent mitogens both in vitro (Estivariz et al., 1982) and in vivo (Estivariz et al., 1988). Furthermore, previous findings from our lab showed that administration of modified synthetic N-POMC_{1–28}, without disulfide bridges, to dexamethasone (DEX)-treated rats induces

S-phase entry in all zones of the adrenal cortex (Torres et al., 2010).

To promote tissue growth proliferating mammalian cells pass through an orderly sequence of phases that comprise the cell cycle (Pestell et al., 1999, for review). Progression through G1 to S phase is promoted by cyclin D1 and cyclin E, which heterodimerize with catalytic subunits, the cyclin-dependent kinases (Cdks), to form active holoenzymes. These active holoenzymes phosphorylate substrates essential for progression through the restriction point of the cell cycle.

The aim of this work was to compare the effects of synthetic peptide N-POMC_{1–28} with disulfide bridges (N-POMC^w), and a modified peptide without disulfide bridges (N-POMC^{w/o}) on cell proliferation in the adrenal cortex using the well-known in vivo model of dexamethasone (DEX)-treated rats. In addition, the pattern of cyclin E expression was analyzed 6 h after administration of ACTH and/or N-POMC. Our results show that in contrast with synthetic modified N-POMC^{w/o}, which increases DNA synthesis in all zones of the adrenal cortex, synthetic N-POMC^w has a mitogenic effect only in the zona glomerulosa and zona reticularis of the adrenal cortex. In addition, within 6 h of N-POMC and ACTH treatment cyclin E expression in the zona glomerulosa was increased, suggesting the

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotrophic hormone; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; DEX, dexamethasone; N-POMC, N-terminal fragment of POMC; POMC, pro-opiomelanocortin; ZG, zona glomerulosa; ZF, zona fasciculata; ZR, zona reticularis.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 7492; fax: +55 11 3091 7366.

E-mail address: clotfi@usp.br (C.F.P. Lotfi).

involvement of this protein in the mitogenic effect on the adrenal cortex.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Sprague-Dawley rats, weighing 250 ± 30 g, were obtained from the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo and maintained in a temperature-controlled environment on a 12-h light/dark cycle. All protocols were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Biomedical Sciences Institute. The animals had free access to tap water and standard rat chow. All experiments were conducted between 9:00 am and 11:00 am. At the indicated time, rats were killed by decapitation, and the adrenal glands were harvested. Trunk blood was collected in chilled tubes containing 3.8% EDTA. The blood was separated into cellular and plasma fractions (10,000 rpm for 15 min at 4 °C), and the plasma was stored at -80 °C until analysis by chemiluminescent immunoassay for ACTH (Immulite; Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA).

2.2. N-POMC₁₋₂₈ peptides synthesis

Two forms of rat N-POMC₁₋₂₈ peptides were synthesized, with and without disulfide bonds, and at least two separate synthetic reactions were performed for the same peptide sequence. The rat N-POMC₁₋₂₈ peptide without disulfide bonds (N-POMC^{w/o}) was synthesized by the Department of Biochemistry and Biophysics of the Federal University of São Paulo (UNIFESP). To avoid undefined disulfide bonds the peptide was synthesized with the replacement of cysteine 2, 8, 20 and 24 residues by methionine. Meanwhile, the rat N-POMC₁₋₂₈ peptide with disulfide bonds (N-POMC^w) in the cysteine 2–24 and 8–20 positions was synthesized by Bachem America Inc. (Torrance, CA, USA).

2.3. Dexamethasone, ACTH and N-POMC₁₋₂₈ treatments

The dexamethasone (Dex) (Achê Laboratórios Farmacêuticos, Campinas, SP, Brazil) treatment was performed as described in Baccaro et al. (2007). Briefly, male Sprague-Dawley rats were divided into seven groups ($n=4-5$): Dex or Dex + ACTH or Dex + N-POMC^{w/o} or Dex + ACTH + N-POMC^{w/o} or Dex + N-POMC^w or Dex + ACTH + N-POMC^w, and control. Dex was administered intraperitoneally at a dose of 50 µg/100 g B.W. once a day at 9:00 am for 2 days. ACTH, N-POMC^w and N-POMC^{w/o} treatments were administered at a concentration of 10^{-7} M in a dose of 100 µl/100 g B.W. Control rats received identical injections of saline only.

2.4. Preparation of fractions and protein lysates

At 6 and 8 h after final treatments, rats were decapitated and the adrenal glands were promptly removed. Adherent adipose tissue was cleaned from the adrenal glands, which were then gently decapsulated to separate capsule/zona glomerulosa (outer fraction; OF) from zona fasciculata/reticularis and medulla (inner fraction; IF). Fractions were rapidly frozen in liquid nitrogen and the medulla was removed from IF. All samples were lysed in ice-cold RIPA (50 mM of Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM of NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 1% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% SDS) and protease inhibitors (1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml of leupeptin, 2 µg/ml of aprotinin and 2 µg/ml of pepstatin). Samples were clarified by centrifugation and the protein concentration was quantified by the Bradford assay.

2.5. Characterization of fractions

Total lysate protein samples from IF and OF (30 µg) were resolved by 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was electroblotted onto Hybond-C nitrocellulose membranes using a semi-dry Bio-Rad apparatus. Non-specific sites were blocked overnight at 4 °C with 5% non-fat dried milk dissolved in TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1% Tween 20, pH 7.5). Membranes were then incubated with one of the following antibodies: anti-cytochrome P450 aldosterone synthase (CYP11B2, 1:100; Chemicon-Millipore Corporate, Billerica, MA, USA), anti-cytochrome P450 11β-hydroxylase (CYP11B1, 1:100; Chemicon), anti-tyrosine hydroxylase (TH, 1:5000; Immunostar Inc. Hudson, WI, USA), β-actin (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), or α-actinin (1:2000; Santa Cruz) for 2 h at room temperature. Proteins were then visualized by chemiluminescent detection with secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit polyclonal antibodies (ECL-Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ, USA).

2.6. BrdU incorporation

The protocol followed was that described in Torres and Lotfi (2007). Briefly, at 12 h after final treatments, all animals received a single intraperitoneal injection of 100 µg BrdU (Sigma, St. Louis, MO, USA) per 100 g BW. At 24 h after final treatments the rats were killed by decapitation, and adrenal glands removed, fixed and embedded in paraffin. Sections (3 µm) were deparaffinized, rehydrated, endogenous peroxidase activity blocked with 0.3% hydrogen peroxide in methanol, hydrolyzed

with 1.5 N HCl, and then incubated with monoclonal anti-mouse-BrdU antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Data obtained from each zone were averaged for each experimental group, and the standard error of the mean was calculated. After an analysis of variance (ANOVA), statistical comparisons were made using the Tukey–Kramer multiple comparisons test. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

2.7. Immunoprecipitation of cyclin E

Cyclin E protein expression was analyzed by immunoprecipitation due to lack of specificity of the antibody when performing immunoblotting only. Total protein lysates (300 µg) were incubated with 20 µl of A-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 1 h at 4 °C. The supernatant obtained after centrifugation was incubated with 1 µg of anti-cyclin E Sc-481 (Santa Cruz) or β-actin (Santa Cruz) overnight at 4 °C. Samples were immunoprecipitated with A-Agarose protein, and the pellet washed with RIPA buffer and boiled. Protein samples were resolved as described before and membranes were incubated with anti-cyclin E (1:1000; Santa Cruz) or β-actin (1:2000; Santa Cruz) for 2 h 30 min at room temperature. Chemiluminescent detection was performed as described above and immunoblot results were quantified by densitometric analysis using the Gel-Pro Imager and the quantification program Gel-Pro Imager kit-Version 1.0 for Windows. The results given are representative of three independent experiments. Ponceau staining was used to monitor protein transfer and total protein loaded.

2.8. Immunohistochemistry for cyclin E

At 6 h after final treatments rats were killed by decapitation; adrenal glands were removed, fixed in 4% paraformaldehyde in a solution of 0.1 M phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) for 8 h at room temperature, and then immersed in PBS plus 6% sucrose for 12 h. After being fixed and deparaffinized, the sections were rehydrated through a graded ethanol series, before being washed with sterile Milli-Q water,

Fig. 1. Effect of N-POMC^w on the percentage of BrdU-positive nuclei in the adrenal cortex of dexamethasone (Dex)-treated rats. Values given are the number of BrdU-positive nuclei expressed as a percentage of the total number of nuclei. The differences between values for BrdU incorporation in Dex versus treated rats (*) and ACTH versus ACTH + N-POMC (#) are indicated. Data were analyzed by ANOVA and the Tukey–Kramer multiple comparisons test. * $p < 0.05$.

PBS, and PBS with 0.5% hydrogen peroxide. Sections were incubated in boiling citrate buffer (pH 6.0) for antigen retrieval, and background staining was blocked using a proprietary solution (Background Blocker; Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA). Then, sections were washed and incubated in PBS with 1:250 monoclonal anti-cyclin E Sc-481 antibody (Sc-481; Santa Cruz). The immune complexes were detected by immunoperoxidase staining with the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and visualized with diaminobenzidine (Sigma Fast; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) followed by counterstaining with Harris' hematoxylin and a saturated solution of lithium carbonate. Adrenal sections incubated in non-immune primary sera tested negative (not shown). Sections of jejunum were used as positive controls.

2.9. Immunoreactive cell count

For the quantification of BrdU incorporation, ten to 15 areas (containing 90–100 nuclei/area) in each section were sampled randomly in the three zones of the adrenal cortex and examined with a 40× objective attached to a Nikon microscope equipped with a video camera. Images were digitalized using Image-Pro Plus, and all immunoreactive nuclear profiles, regardless of the intensity of the immunostaining, were counted. Each cortical zone of each adrenal gland was determined by the morphology/constitution of cells. The percentage of BrdU-labeled nuclei was determined, which is defined as the number of BrdU-positive nuclei expressed as a percentage of the total number of nuclei.

3. Results

3.1. Synthetic N-POMC^w has the same biological effect as N-POMC^{w/o} in ZG and ZR, but not in the ZF

In previous work (Torres et al., 2010) we demonstrated that the administration of synthetic modified N-POMC^{w/o} to DEX-treated rats induces S-phase entry in all zones of the adrenal cortex. Here we described the effect of administration of synthetic N-POMC^w on the number of BrdU-labeled nuclei in adrenal cortex. In DEX rats, administration of 10^{-7} M N-POMC^w significantly increased the percentage of BrdU-positive cell nuclei in the ZG and ZR, by 15% and 12% respectively (Figs. 1a, c and 2). We observed the same effect in these zones after administration of N-POMC^{w/o} (Torres et al., 2010). Therefore, in contrast to N-POMC^{w/o}, the N-POMC^w did not significantly alter the number of BrdU-positive nuclei in the ZF. Moreover, in the ZR, where Dex administration blocked the BrdU incorporation observed in control rats, the N-POMC^w treatment restored the number of BrdU-positive nuclei. ACTH treatment

Fig. 2. Localization of BrdU-positive nuclei in the adrenal cortex. Adrenal sections were obtained from rats treated for two days with: (a) DEX (50 µg/100 g B.W.); (b) ACTH (10^{-7} M); (c) N-POMC^{w/o} (10^{-7} M); (d) N-POMC^w (10^{-7} M); (e) ACTH + N-POMC^{w/o}; (f) ACTH + N-POMC^w. For the quantification of BrdU incorporation shown in Fig. 1, 10–15 areas in each section were sampled randomly in the three zones. BrdU-positive nuclei are stained brown. Sections were counterstained with Harris' hematoxylin and differentiated with a saturated solution of lithium carbonate. Bars 100 µm.

Fig. 3. Characterization of the outer (OF) and inner (IF) fractions of rat adrenals. (a) Aldosterone synthase (Cyp 11B2) expression. (b) Steroid 11 β -hydroxylase (Cyp11B1) expression. (c) Tyrosine hydroxylase (TH) expression. IF with medulla intact (IF+M) or removed (IF-M). * $p < 0.05$ compared with IF+M. $n = 3$.

increased BrdU incorporation in all adrenal zones (Baccaro et al., 2007) and, also, was more effective than N-POMC^w in increasing DNA synthesis in the ZR (40% versus 17%). Furthermore, in the ZG there was no difference in the number of BrdU-positive nuclei after N-POMC^w and ACTH treatment. The combination ACTH + N-POMC^w (Figs. 1 and 2d) showed distinct effects on different adrenal zones. There was a significant increase (20%) in BrdU-positive nuclei in the ZG, no significant effect in the ZF ($p < 0.07$) and a significant decrease (23%) in the number of BrdU-positive nuclei in the ZR. Administration of ACTH and N-POMC^w in combination had a negative influence on the ZR, decreasing the number of BrdU-positive cells by 22.9% in relation to ACTH treatment alone. On the other hand, in the ZG and ZF, the same treatment did not change the number of BrdU-positive nuclei when compared with ACTH alone.

In order to estimate the N-POMC levels achieved in the plasma after i.p. injection, we analyzed the ACTH concentration in the

plasma of animals treated with 10^{-7} M ACTH. We observed that 15 min after ACTH injection the concentration of ACTH in the circulation was 5.3×10^{-11} M (240.0 ± 86.1 pg/ml), decreasing to 3.7×10^{-11} M (168.2 ± 39.5 pg/ml) and 0.95×10^{-11} M (43.2 ± 15.1 pg/ml), after 30 min and 2 h, respectively (Fig. S1). Therefore, the ACTH concentration detected in the plasma is similar to the evening pulse of ACTH in rat plasma, which is reported as 151 ± 43 pg/ml (Usategui et al., 1976). As the effect of N-POMC peptides observed in our experiments is of the same order of magnitude as that of ACTH, it is likely that the plasma N-POMC concentration is similar to that determined for ACTH.

3.2. Outer and inner fractions are representative of ZG and ZF + ZR

In order to determine the quality of samples after subdivision of the adrenal cortex, we analyzed the expression of Cyp11B2,

Fig. 4. Analysis of cyclin E expression 6 h after treatments. Adrenal gland outer (OF) and inner (IF) fraction preparations containing total protein were obtained from rats treated for two days with saline only (control) or with dexamethasone (DEX; 50 μ g/100 g B.W.) followed by ACTH (10^{-7} M) and/or N-POMC^{w/o} (10^{-7} M). * $p < 0.05$. $n = 3$.

Fig. 5. Immunolocalization of cyclin E expression in adrenal cortex 6 h after treatments. Adrenal sections were obtained from rats treated for two days with DEX (50 µg/100 g B.W.) and (a) saline; (b) ACTH (10^{-7} M); (c) N-POMC^{w/o}; (d) ACTH + N-POMC^{w/o}; (e) N-POMC^w; (f) ACTH + N-POMC^w. Cyclin E-positive cells are stained brown. Sections were counterstained with Harris' hematoxylin and differentiated with a saturated solution of lithium carbonate. Bars 100 µm and 50 µm (insets).

Cyp11B1 and tyrosine hydroxylase (TH) in the outer (OF) and inner (IF) fractions obtained. We observed that Cyp11B2 was expressed in the OF but not in IF (Fig. 3a), whereas expression of Cyp11B1 was stronger in IF, irrespective of whether the medulla was present or not (Fig. 3b). Furthermore, the analysis of TH expression showed the efficiency of removal of the medulla from the IF (Fig. 3c). These results characterized the OF and IF as representative of, respectively, ZG and ZF + ZR.

3.3. ACTH and N-POMC^{w/o} increase cyclin E expression in the outer fraction of adrenal cortex

In DEX rats we observed a decrease of cyclin E expression compared to control in the OF but not in IF (Fig. 4a). On the other hand, 6 h after treatment with ACTH, N-POMC^{w/o}, or a combination of both, an increase of cyclin E expression was observed in the OF fraction (Fig. 4b). At 8 h after ACTH and N-POMC^{w/o} treatments cyclin E remained up-regulated in the OF (not shown). No change in cyclin E expression was observed in the IF in these animals in comparison with DEX rats.

3.4. Immunolocalization of cyclin E expression in adrenal cortex

The results of the immunohistochemistry assay show that cyclin E expression in DEX rats was more restricted to cells of the ZR and ZF, and mainly in the cytoplasm of the outer ZF cells (Fig. 5a). Administration of ACTH, N-POMC^{w/o}, N-POMC^w or the combination of ACTH and N-POMC^{w/o} or ACTH and N-POMC^w (Fig. 5b–f) produced an increase in the number of cyclin E-positive cells (nuclei and cytoplasm) in the ZG. Interestingly, in the ZF a decrease in cyclin E labeling was observed in the cytoplasm of the constituent cells. Taken together these results show that N-POMC and ACTH are found to increase cyclin E expression in the outer zone of the adrenal cortex, irrespective of the analytical method used. Moreover, fractioning of the adrenal cortex is a reliable method to analyze protein expression in the adrenal cortex.

4. Discussion

In this study, we investigated the mitogenic effect of synthetic N-POMC_{1–28} peptides on the adrenal cortex of rats previously

treated with dexamethasone. We compared the mitogenic effect of modified synthetic N-POMC^{w/o} peptide, without disulfide bridges and with cysteines replaced by methionines, and a synthetic N-POMC^w with the disulfide bridges between Cys² and Cys²⁴ and between Cys⁸ and Cys²⁰. Our results show that N-POMC^w increases the number of BrdU-positive nuclei only in the ZG and ZR, whereas treatment with N-POMC^{w/o} increased the number of BrdU-positive cells in all zones of the adrenal cortex. The absence of a response to N-POMC^w in the ZF is intriguing.

This observation raises a question concerning the differential composition of extracellular matrix (ECM) proteins and the microenvironment in rat adrenal cortex. In fact, the ECM and integrins are differentially expressed in rat adrenal cortex and moreover, in vitro, ACTH-induced proliferation in glomerulosa and fasciculata cells depends on the specific composition of the ECM (Otis et al., 2007).

It is noteworthy that only in the ZG did both N-POMC_{1–28} peptides show induction of DNA synthesis similar to that produced by ACTH_{1–39}. Furthermore, N-POMC_{1–28} was not found to potentiate the mitogenic action of ACTH_{1–39} on the adrenal cortex. These results are in agreement with those of Fassnacht et al. (2003) who demonstrated that a synthetic N-POMC^w is capable of stimulating proliferation of both adrenocortical tumor cells and primary cell cultures of bovine adrenal glands. However, these in vitro data contrast somewhat with the finding that peripheral administration of this peptide to POMC^{−/−} mice reduces food intake and body weight but does not affect adrenal growth (Coll et al., 2006).

The primary sequence of the amino terminal of POMC is highly conserved throughout mammals, suggesting an important biological role for this peptide (Seger and Bennett, 1986). The arrangement of disulfide bridges at its extreme N-terminal end inducing a hairpin tertiary structure appeared to be essential for targeting POMC to the regulated secretory compartment of the cell (Denef et al., 2001). Although N-POMC^{w/o} is not a natural peptide its amino acid sequence is similar to that of N-POMC^w. While the literature contains a body of data showing that the disulfide bridges are important to the biological effects of N-POMC, the largely comparable results obtained with the two peptides in the present study, as well as in previous work from our laboratory, suggest that the conformational properties of N-POMC^{w/o}, without the disulfide bridges, can determine its proliferative effects in the adrenal cortex.

Using two different approaches we examined the role of cyclin E expression in the proliferation observed in the adrenal cortex after treatment with N-POMC^{w/o} and ACTH. This resulted in experimental evidence to show that the protein fractioning of the adrenal cortex is a reliable approach. Moreover, we showed that 6 h after N-POMC or ACTH treatment the cyclin E expression was increased in the outer zone of the adrenal cortex, irrespective of the approach used. However, the decrease in cytoplasmic labeling for cyclin E among the outer ZF cells, at 6 h after ACTH and N-POMC administration, together with the increase in the number of cyclin E-positive cells in the ZG is enigmatic and of interest.

The present study shows that altered expression of the cell cycle regulator protein cyclin E and an increase in BrdU-positive nuclei are evidence of a role for cyclin E in the mitogenic effect of ACTH and N-POMC on the adrenal cortex.

Declaration of interest

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

Funding

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

Acknowledgements

We thank Dr. Maria Aparecida Juliano from the Department of Biochemistry and Biophysics of the Federal University of São Paulo (UNIFESP) for the synthesis of modified N-POMC^{w/o} peptide, Dr. Berenice B. Mendonça and Helena Valassi from the Laboratory of Hormones and Molecular Genetics of the Department of Clinical Medicine of the University of São Paulo for the ACTH assay in rat plasma, and Maria Terêsa Machini de Miranda from the Biochemistry Department of the Institute of Chemistry of the University of São Paulo for suggestions on the discussion in the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.mce.2010.12.012.

References

- Baccaro, R.B., Mendonça, P.O., Torres, T.E., Lotfi, C.F., 2007. Immunohistochemical Jun/Fos protein localization and DNA synthesis in rat adrenal cortex after treatment with ACTH or FGF2. *Cell Tissue Res.* 328 (1), 7–18.
- Coll, A.P., Fassnacht, M., Klammer, S., Hahner, S., Schulte, D.M., Piper, S., Tung, Y.C., Challis, B.G., Weinstein, Y., Allolio, B., O'Rahilly, S., Beuschlein, F., 2006. Peripheral administration of the N-terminal pro-opiomelanocortin fragment 1–28 to Pomc^{−/−} mice reduces food intake and weight but does not affect adrenal growth or corticosterone production. *J. Endocrinol.* 190, 515–525.
- Denef, C., Roudbaraki, M., Van Bael, A., 2001. Growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain of pro-opiomelanocortin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28 (3), 239–243.
- Estivariz, F.E., Carino, M., Lowry, P.J., Jackson, S., 1988. Further evidence that N-terminal pro-opiomelanocortin peptides are involved in adrenal mitogenesis. *J. Endocrinol.* 116 (2), 201–206.
- Estivariz, F.E., Iturriza, F., McLean, C., Hope, J., Lowry, P.J., 1982. Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiocortin peptides. *Nature* 297 (5865), 419–422.
- Fassnacht, M., Hahner, S., Hansen, I.A., Kreutzberger, T., Zink, M., Adermann, K., Jakob, F., Troppmair, J., Allolio, B., 2003. N-terminal proopiocortin acts as a mitogen in adrenocortical tumor cells and decreases adrenal steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2171–2179.
- Lowry, P.J., Silas, L., McLean, C., Linton, E.A., Estivariz, F.E., 1983. Pro-gammamelanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth. *Nature* 306 (5938), 70–73.
- New, M.I., 1998. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Annu. Rev. Med.* 49, 311–328.
- Otis, M., Campbell, S., Payet, M.D., Gallo-Payet, N., 2007. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. *J. Endocrinol.* 193 (3), 331–347.
- Pestell, R.G., Albanese, C., Reutens, A.T., Segall, J.E., Lee, R.J., Arnold, A., 1999. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocrine Rev.* 20, 501L 534.
- Seger, M.A., Bennett, H.P., 1986. Structure and bioactivity of the amino-terminal fragment of pro-opiomelanocortin. *J. Steroid Biochem.* 25 (5B), 703–710.
- Torres, T.E., Lotfi, C.F., 2007. Distribution of cells expressing Jun and Fos proteins and synthesizing DNA in the adrenal cortex of hypophysectomized rats: regulation by ACTH and FGF2. *Cell Tissue Res.* 329, 443L 455.
- Torres, T.E., de Mendonça, P.O., Lotfi, C.F., 2010. Synthetic modified N-POMC_(1–28) controls in vivo proliferation and blocks apoptosis in rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res.* 341 (2), 239–250.
- Usategui, R., Oliver, C., Vaudry, H., Lombardi, G., Rozenberg, I., Mourre, A.M., 1976. Immunoreactive α -MSH and ACTH levels in rat plasma and pituitary. *Endocrinology* 98 (1), 189–196.

APÊNDICE C - Artigo DE MENDONCA et al., 2012

DE MENDONCA, P. O. et al. N-POMC(1-28) increases cyclin D expression and inhibits P27(kip1) in the adrenal cortex. **Mol Cell Endocrinol**, Dec 5 2012.

N-POMC_{1–28} increases cyclin D expression and inhibits P27^{kip1} in the adrenal cortex

Pedro O.R. de Mendonça^a, Cleber W. Liria^b, Maria Teresa Machini^b, Claudimara F.P. Lotfi^{a,*}

^a Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxxxx

Keywords:
Adrenal cortex
N-POMC_{1–28}
ACTH
Cyclin D
P27^{kip1}
Proliferation

ABSTRACT

The Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and Pro-opiomelanocortin (POMC) 1–28 N-terminal peptide (N-POMC_{1–28}) have been shown to act as an adrenal mitogen *in vivo*. A possible role for cyclin E in the zona glomerulosa (ZG) proliferation, following ACTH and/or N-POMC_{1–28} administration, has been previously demonstrated. In this study, we investigated the effect of ACTH and N-POMC_{1–28} on the expression of adrenal cortex proteins related to cell cycle control such as cyclins D and P27^{kip1}. The administration of N-POMC upregulated cyclin D1 and D2 expression in the outer zone of the adrenal cortex; cyclin D3 expression was upregulated in the cortex inner zone even after administration of ACTH. Both ACTH and N-POMC peptides induced a decrease in the P27^{kip1} expression in the ZG. These novel findings suggest that the POMC-derivate peptides, ACTH and N-POMC, promote proliferation in the adrenal cortex by upregulating the D2 and D3 cyclins and downregulating the P27^{kip1} expression.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The adrenal gland is an organ of dynamic growth that requires stimuli from peptides derived from the pituitary gland in order to maintain the proliferating rate of its basal cells. Fragments of the N-terminal portion of POMC, known as N-POMC, have been shown to stimulate adrenal cell proliferation (Estivariz et al., 1982; Lowry et al., 1983). Among these fragments, the N-POMC_{1–28} and N-POMC_{2–54} peptides were found to be potent mitogens, both *in vitro* (Estivariz et al., 1982) and *in vivo* (Estivariz et al., 1988). Previous findings from our group showed that the administration of modified synthetic N-POMC_{1–28} peptides induced *in vivo* and *in vitro* proliferation in the adrenal cortex (Torres et al., 2010; Mendonça and Lotfi, 2011; Mattos et al., 2011). It has also been shown that cyclin E is over-expressed in the zona glomerulosa (ZG) after mitogenic stimuli suggesting a mitogenic role for cyclin E in the adrenocortex (Mendonça and Lotfi, 2011). However, the potential effect of N-POMC or ACTH stimuli on the expression of other proteins of the cyclin D family, which like cyclin E also regulate the cell cycle progression from the G1 through the S phase in the rat adrenal (for review, Pestell et al., 1999), has not been investigated.

This study evaluated the expression pattern of cyclin D (D1, D2, and D3) and Cdk-inhibitory protein P27^{kip1} in the adrenal cortex of dexamethasone-treated rats after administration of ACTH and/or

modified N-POMC_{1–28} peptides, with cysteine correctly aligned disulfide bonds (N-POMC^{Cys}) or with methionine (N-POMC^{Met}). Our results strongly suggest the involvement of specific cyclins and Cdk-inhibitors in the proliferative response of POMC peptides in a zone-dependent pattern.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Sprague–Dawley rats, at average weights of 250 ± 30 g, were obtained from the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo and maintained in a temperature-controlled environment and 12-h light/dark cycle. The Animal Experimentation Ethics Committee from the Biomedical Sciences Institute approved the study. The animals were fed with standard rat feed and received water *ad libitum*. All experimental procedures were conducted between 09 and 11 am; the rats were euthanized by decapitation and adrenal glands were harvested.

2.2. N-POMC_{1–28} peptides synthesis

Two types of rat N-POMC_{1–28} peptides were synthesized: with cysteine (N-POMC^{Cys}) and with methionine (N-POMC^{Met}) as de-

Abbreviations: ACTH, Adrenocorticotrophic hormone; DEX, dexamethasone; POMC, pro-opiomelanocortin; N-POMC, N-terminal fragments of POMC; POMC, pro-opiomelanocortin; ZG, zona glomerulosa; ZF, zona fasciculata; ZR, zona reticularis.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 7492; fax: +55 11 3091 7366.

E-mail address: clotfi@usp.br (C.F.P. Lotfi).

scribed in Mendonca and Lotfi (2011). The identities of the peptides were confirmed by analysis of their amino acid composition. The analyses were performed in the Peptide Chemistry Laboratory from the Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, at the University of São Paulo.

2.3. Dexamethasone, ACTH, and N-POMC_{1–28} treatments

The concentration of 50 µg/100 g of body weight (BW) of Dexamethasone (DEX) (Aché Laboratórios Farmacêuticos, Campinas, SP, Brazil) was administered intraperitoneally, once a day at 9 am for 2 days, with the purpose of inhibiting the HPA axis. The circulating ACTH levels were measured in the plasma from trunk blood samples collected at the time of euthanasia (at 24, 32, and 48 h after the second DEX) with an immunochemiluminescent assay (Immulite; Diagnostic Products, Los Angeles, Calif., USA). The control animals received the same treatment schedule applied to the experimental animals, however with saline injections. The rats were divided into five groups ($n = 4–5$) 28 h after the last DEX injection and were given a single intraperitoneal injection of ACTH (3.3×10^{-2} µg/100 g BW), N-POMC^{Cys} (3.2×10^{-2} µg/100 g BW), N-POMC^{Met} (4.5×10^{-2} µg/100 g B.W.), ACTH + N-POMC^{Met} or saline (100 µl/100 g B.W.). The levels of the cyclins D and P27^{kip1} were measured at 4, 6, or 8 h after treatment with the peptides, based on the pattern of cyclins expression observed in adrenocortical cells *in vitro* after a mitogenic stimuli (Lotfi et al., 2000; Schwindt et al., 2003).

2.4. Preparation of lysates

The preparation of protein lysates was performed as described in Mendonca and Lotfi (2011). Briefly, at 4, 6, or 8 h after the final treatments, the adrenal glands were removed and gently decapsulated to separate the capsule/zona glomerulosa (ZG + Capsule) from the zona fasciculata/reticularis and medulla (ZF + ZR). The medulla was removed from the ZF + ZR and the samples were lysed in ice-cold RIPA and protease inhibitors. The protein concentrations were quantified by the Bradford assay.

2.5. Detection of cyclins D and P27^{kip1} protein expression

Immunoblotting was performed as described in Mendonca and Lotfi, 2011. Briefly, protein samples were sorted in SDS–PAGE and membranes incubated with the following antibodies: anti-cyclin D1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-cyclin D2 (1:1000; Santa Cruz), anti-cyclin D3 (1:3000, Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA), anti-P27 (1:1000; Santa Cruz), or β-actin (1:2000, Santa Cruz) for two hours at room temperature or overnight at 4 °C. Proteins were detected using chemiluminescent secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse polyclonal antibodies (ECL-Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ, USA). The immunoblot results were densitometrically quantified using the Gel-Pro Imager and Gel-Pro Imager kit Version 1.0 quantification program for Windows.

2.6. Analysis of cyclin D3 and P27^{kip1} through immunohistochemistry

The analysis through immunohistochemistry was performed as described in Mendonca and Lotfi (2011). Briefly, rats were euthanized by decapitation 4 h (for cyclin D3) or 6 h (for P27^{kip1}) after the final treatments; adrenal glands were removed, fixed in 4% paraformaldehyde in a solution of 0.1 M phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) and deparaffinized sections were rehydrated. Sections were incubated for antigen retrieval, background staining was blocked, and incubated in PBS with 1:200 anti-P27 (C-19) antibody (Santa Cruz) or 1:200 anti-cyclin D3 (Cell Signaling). The im-

mune complexes were detected by immunoperoxidase followed by counterstaining with Harris' hematoxylin and a saturated solution of lithium carbonate. The adrenal sections incubated in non-immune primary sera tested negative (data not shown).

2.7. Statistical analysis

The results were representative of three independent experiments. Data were presented as the mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance was determined using Tukey–Kramer Multiple Comparisons Test after an analysis of variance (ANOVA) except where otherwise noted. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

In this study, the expression of another important G0–G1 cell cycle transition protein family, the D cyclins and the P27^{kip1} cell cycle inhibitor protein, a G1 arrest cell cycle protein, was evaluated. The potential role of cyclin E in the proliferation of the adrenal cortex when triggered by ACTH and N-POMC synthetic peptides has been demonstrated in a previous study (Mendonca and Lotfi, 2011).

3.1. HPA axis inhibition after DEX administration

A significant reduction of 44% in the circulating levels of ACTH was observed 24 h after the last DEX administration. No difference in the circulating levels of ACTH was observed at 32 and 48 h after the last DEX injection (Table 1). Based on these findings and based on previous results reported in Mendonca and Lotfi (2011), injections of the mitogenic peptides were initiated 28 h after the last treatment with DEX.

3.2. HPA axis inhibition upregulated P27^{kip1} and downregulated cyclins D2 and D3 expression in the adrenal cortex

A 2.2-fold increase in the P27^{kip1} protein expression was observed in the inner part of the adrenal cortex, ZF/ZR, 4 h after the last DEX injection. However, no changes in the expression level of cyclin D proteins were observed (Fig. 1A).

Cyclin D2 and P27^{kip1} protein expression levels significantly decreased after 6 h in the ZF/ZR (0.3-fold and 0.4-fold decrease, respectively), when compared to controls, whereas a 0.3-fold decrease in cyclin D3 was observed in the entire cortex (Fig. 1B).

A lower expression level (0.2-fold decrease) of cyclin D2 was kept in the ZF/ZR, 8 h after the DEX treatment, whereas the cyclin D3 expression was lower in the entire cortex (0.7-fold and 0.3-fold decrease in ZF/ZR and ZG, respectively). At this same time point in the treatment, the P27^{kip1} protein expression presented a 0.6-fold decrease and no modulation effect in ZF/ZR and ZG, respectively (Fig. 1C1–C4).

Table 1

ACTH plasma concentration (pg/ml) at 24, 32, and 48 h after the last dexamethasone (DEX) injection.

Time after the second injection of DEX	Saline	DEX (50 µg/100 g B.W.)
24 h	100 (±25)	51 (±20) ^a
32 h	128 (±52)	175 (±49)
48 h	55 (±23)	50 (±17)

Statistical significance was evaluated using unpaired *T*-test.

^a $p < 0.05$; $n = 3$.

Fig. 1. Analysis of cyclin D and P27^{kip1} expression at 4 (A1–A4), 6 (B1–B4), and 8 h (C1–C4) after the last injection of dexamethasone (DEX; 50 µg/100 g BW) in rats. Adrenal glands were separated in two fractions containing ZG + Capsule and ZF + ZR and total protein was extracted in RIPA buffer for the immunoblot analysis. Control animals received saline only (DEX–). Comparisons between relative expression levels of DEX– were performed for each cyclin. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *n* = 4–5.

3.3. The administration of N-POMC with Cys bridge upregulated the cyclins D1 and D2 in the outer zone of the adrenal cortex

The expression of cyclin D1 was not altered by the ACTH or N-POMC^{Met} injections if compared to the DEX-treated animals, regardless of the treatment time or adrenal zone analyzed (Fig. 2). In addition, the ACTH showed no modulation effect on the cyclin D2 expression in the adrenal cortex whereas the 8 h-N-POMC^{Met} treatment induced 1.1-fold increase in cyclin D2 expression in the ZF/ZR, and 0.2-fold decrease in the ZG (Fig. 2C2). On the other hand, the combination of both treatments promoted the opposite effect on the cyclin D1 and D2 expression in ZF/ZR; cyclin D1 presented a 0.4-fold decrease, and cyclin D2 a 3.0-fold increase compared to the control at 8 and 4 h after treatment, respectively (Fig. 2C1 and A2). However, the expression levels of cyclin D1 and D2 were 1.6-fold and 3.0-fold higher, respectively, in ZG 6 h after administration of N-POMC^{Cys} if compared to DEX-treated rats (Fig. 2B1 and B2).

3.4. The ACTH and synthetic N-POMC peptides upregulated the cyclin D3 expression in the inner adrenal zones

Increments of 1.5-fold, 1.5-fold, and 1.8-fold in the cyclin D3 expression levels in ZF/ZR were observed 4 h after administration of ACTH, N-POMC^{Met}, or N-POMC^{Cys}, respectively (Fig. 3). These increments were sustained after 6 h of ACTH or N-POMC^{Met} peptide administration, and a 3.5-fold increase was observed after the N-POMC^{Cys} peptide injection (Fig. 3B1). N-POMC^{Met} alone or in combination with ACTH led to 2.3-fold and 2.4-fold increments of cyclin D3 expression in the inner adrenal zone 8 h after treatment (Fig. 3C1). In contrast, the combination of ACTH and N-POMC^{Met} treatment promoted 0.5-fold decrease of cyclin D3 expression in ZG (Fig. 3B1). Other treatments did not alter the expression of cyclin D3 in the same zone. The immunohistochemical analysis revealed that the expression of cyclin D3 was not altered after 4 h from DEX treatment when compared to the saline control (Fig. 4A and B). However, cyclin D3 was increased in ZF after

Fig. 2. Analysis of cyclin D1 and D2 expression at 4 (A1–2), 6 (B1–2), and 8 h (C1–2) after injections. ZG + Capsule and ZF + ZR adrenal preparations containing total protein were obtained from rats treated for 2 days with dexamethasone (DEX; 50 µg/100 g BW) followed by saline (DEX+) or ACTH (10^{-7} M) and/or N-POMC^{Met} (10^{-7} M) or N-POMC^{Cys} (10^{-7} M). Comparisons between relative expression levels of DEX+ were performed. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; $n = 4-5$.

treatment with ACTH (Fig 4 C) and N-POMC peptides (Fig 4D and E), although the latter has shown a lower intensity.

3.5. P27^{kip1} is downregulated in ZG after administration of ACTH and N-POMC peptides

An increased expression of P27^{kip1} was observed in ZF/ZR (2.2-fold, 1.9-fold, and 1.4-fold, respectively) after 4 h of ACTH, N-POMC^{Met}, or N-POMC^{Cys} injections compared to the controls. On the other hand, the administration of N-POMC^{Cys} downregulated the P27^{kip1} expression 0.5-fold in ZG (Fig. 3A2). Six hours after administration of N-POMC^{Met} and ACTH + N-POMC^{Met} a 0.5-fold and 0.6-fold decrease in the P27^{kip1} expression in ZF/ZR were observed whereas N-POMC^{Cys} maintained the same expression level (1.4-fold increase compared to the control). In the ZG all peptides induced a reduction in P27 expression (Fig. 3B2). The immunohistochemistry analysis revealed that the P27^{kip1} expression was upregulated in the entire cortex following HPA axis inhibition

(Fig. 5A) whereas ACTH expression levels reduced it to control levels (Fig. 5B). The use of N-POMC peptides downregulated the expression of P27^{kip1} particularly in the ZF and ZR (Fig. 5C and D). This downregulation of P27^{kip1} expression was reversed in ZF/ZR 8 h after treatment; the P27^{kip1} expression was significantly increased after administration of N-POMC^{Met} alone or in combination with ACTH (2.2-fold and 2.1-fold, respectively). In addition, the P27^{kip1} expression levels were reduced to control levels after administration of N-POMC^{Cys} (Fig. 3C2). No significant changes in the P27^{kip1} expression were observed in the ZG 8 h after treatment. However, the combination of ACTH and N-POMC^{Met} maintained P27^{kip1} expression at a level similar to that observed at 6 h treatment and lower than that observed in the DEX-control.

4. Discussion

In this study, the mechanisms involved in the proliferative response of the adrenal cortex to synthetic N-POMC₁₋₂₈ peptides

Fig. 3. Analysis of cyclin D3 and P27^{kip1} expression at 4 (A1–2), 6 (B1–2), and 8 h (C1–2) after injections. ZG + Capsule and ZF + ZR adrenal preparations containing total protein were obtained from rats treated for 2 days with dexamethasone (DEX; 50 µg/100 g BW) followed by saline (DEX+) or ACTH (10^{−7} M) and/or N-POMC^{Met} (10^{−7} M) or N-POMC^{Cys} (10^{−7} M). Comparisons between relative expression levels of DEX+ were performed. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *n* = 4–5.

and ACTH were investigated. It has been already established that ACTH and different types of N-POMC peptides may promote proliferation in the adrenal cortex (Estivariz et al., 1982; Lowry et al., 1983). 1–28 N-POMC was isolated originally from human pituitary gland and was considered an artifact rather than a physiological POMC product (McLean et al., 1981). Nevertheless this peptide has been used to investigate the biological role of this highly conserved region of POMC. In fact, the pattern of cyclin E expression in the adrenal gland after mitogenic administration has been previously established (Mendonca and Lotfi, 2011). However, whether other cell cycle proteins, such as the cyclin D family and Cdk inhibitory proteins involved in the ACTH and N-POMC mitogenic stimuli, may also have an effect on the adrenal gland is still unknown.

The present study aimed to investigate the response patterns of cyclins D1, D2, and D3, and P27^{kip1} protein expression after administration of POMC mitogen peptides in the zone-specific adrenal cortex of dexamethasone-treated rats. The experimental model

used in this study was established previously in Baccaro et al. (2007) and Torres et al. (2010). However, our study differs from those on the assessment of the time point at which the DEX treatment causes the least effect by itself, through determination of circulating ACTH levels in the animals' plasma. Although the required time where the DEX attenuates its effect was not exactly determined, it was assumed the period between 24 and 32 h, after the second injection of DEX, as a period to start the treatments. In fact, the observed effects on the adrenal cortex caused by inhibition of HPA axis could be, in part, due to the endogenous ACTH that is no longer repressed. However, the endogenous ACTH available was not sufficient to modulate cyclin D or p27 expression. Moreover, it was observed significant difference in the expression of cyclins and p27 between treatments only with DEX and ACTH in the adrenal glands. Nevertheless, the determination of an optimal mitogen-treatment time is required because the DEX-direct effect may interact with glucocorticoid receptors in the adrenal (Boyle et al., 2010). Our results reveal that inhibition of the HPA axis in-

Fig. 4. Immunolocalization of Cyclin D3 expression in the adrenal cortex 4 h after treatments. Adrenal sections were obtained from rats treated with: A – saline only or two days with DEX (50 µg/100 g BW) followed by B – saline or C – ACTH (10^{-7} M) or D-N-POMC^{Met} or E-N-POMC^{Cys}. Cyclin D3-positive cells are stained brown. Sections were counterstained with Harris' hematoxylin and differentiated with a saturated solution of lithium carbonate. ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculata. Bars 50 µm.

creases the P27^{kip1} expression, which is followed by a reduction in cyclin D2 and D3 expression levels in the adrenal cortex.

This is the first report showing that acute inhibition of HPA axis increases the Cdk-inhibitory protein expression while it also reduces the cyclin D expression in the adrenal gland. Although the analysis of the role of these proteins in the cell cycle of adrenal has not been determined, the expression pattern of cyclin D and P27^{kip} could promote cell cycle arrest, resulting in lower proliferation in the adrenal cortex due to DEX treatment. Moreover, the data indicate a basal protein expression level of cyclin D throughout the cortex; however, the expression is higher in ZG than in ZF and ZR. The fact that cells in the sub-capsular niche and ZG are major adrenal cortical progenitor cells may explain the difference observed among zones (King et al., 2009). The administration of N-POMC with Cys bridges increased the cyclin D1 and D2 expression only in the outer zone of the adrenal cortex, whereas ACTH and both N-POMC peptides upregulated the cyclin D3 expression in the inner zones. These data suggest that each zone in the adrenal cortex has a pattern of cyclin D protein expression that depends on the mitogenic stimuli and treatment time frames. To the best of our knowledge, no data correlating the cyclin D expression with adrenal cell proliferation in adult rats have been reported.

It has been observed that the levels of cyclin D1 did not change in the adrenal gland of sheep fetuses after administration of

N-POMC_{1–77} and N-POMC_{1–49} peptides (Coulter et al., 2002). In contrast, in a study done in baboons, the expression of cyclin D1, cyclin E, and Ki67 decreased, while the 3 beta-HSD expression increased, in the fetal adrenal cortex, particularly in the definitive zone, between the mid and late baboon gestational period (Dumitrescu et al., 2007). Furthermore, the action of angiotensin II on the human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cell line correlates with the expression of cyclin D1 in the proliferative response triggered by this hormone (Watanabe et al., 1996). The cyclin D1 and D2 expression were upregulated in the outer zone by 1–28 N-POMC^{Cys}, while N-POMC^{Met} did not produce the same effect. Both peptides showed similar effect by inducing the cell cycle S-phase (Mendonca and Lotfi, 2011). Altogether, these findings suggest the involvement of different cyclins. While cyclin D1, D2, and D3 share 75–78% amino acid sequence homology in the region called the cyclin box, the CDKs binding site, the homology outside this region is only 37–39% (Inaba et al., 1992; Xiong et al., 1991). Hence, it is possible that the cyclin function occurs in a non-redundant and possibly in a tissue-specific pattern (Cierny et al., 2002).

The present study shows P27^{kip1} downregulation in ZG after administration of POMC peptides, ACTH, and N-POMC, which could be occurring due to protein degradation through ubiquitination (for review, Kitagawa et al., 2009). The degradation of Cdk inhibitors is important for the activation of cyclin/CDK complexes, such

Fig. 5. Immunolocalization of P27^{kip1} expression in the adrenal cortex 6 h after treatments. Adrenal sections were obtained from rats treated with: A – saline only or two days with DEX (50 μg/100 g BW) followed by B – saline or C – ACTH (10^{−7} M) or D-N-POMC^{Met} or E-N-POMC^{Cys}. P27^{kip1}-positive cells are stained brown. Sections were counterstained with Harris' hematoxylin and differentiated with a saturated solution of lithium carbonate. C: capsule; ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculata. Bars 50 μm.

as cyclin D/Cdk4–6 and E/Cdk2, allowing the G1/S cell cycle transition (Ray et al., 2009). P27^{−/−} animals are larger than their wild-type counterparts, with organs such as thymus, pituitary, gonads, and adrenal glands increased in size. However, except for the pituitary they have no tumors. Moreover, these animals did not show alterations in the concentration of corticosterone and the histological analysis showed marked hyperplasia of their adrenal medulla with the adrenal cortex as relatively normal (Nakayama et al., 1996), suggesting the involvement of P27 in organ hyperplasia. The results in this study corroborate the results from *in vivo* studies showing that ACTH can modulate the proliferation of adrenocortical cells in the ZG by decreasing the expression of P27^{kip1} (Kobayashi et al., 2006). Additionally, our results indicate that the downregulation of P27^{kip1} expression is involved in the proliferative response of the N-POMC stimuli in ZF and ZR. These results highlight the importance of this protein in the cell cycle control, suggesting that the P27^{kip1} inhibition is essential for adrenal cortex proliferation.

In summary, our study shows, for the first time, that POMC-derivate peptides, ACTH and N-POMC, promote proliferation in the adrenal cortex likely by upregulating the cyclins D2 and D3 and downregulating the P27^{kip1} expression. In addition, we observed that the cell cycle regulation was time-dependent and zone-spe-

cific. These latest results suggest a sequence of key events comprising the mitogenic response triggered by N-POMC_{1–28} in the adrenal cortex of rats (Fig. 6). This sequence assumes four critical steps before DNA synthesis: (1) Recognition of N-POMC_{1–28} and activation of an unknown receptor; (2) activation of the ERK1/2 pathway (Pepper and Bicknell, 2009; Mattos et al., 2011), (3) likely induction of the immediate c-fos and c-jun early genes, similar to ACTH (Baccaro et al., 2007; Torres and Lotfi, 2007), and (4) induction of cyclin D2, D3, and E late genes (Mendonca and Lotfi, 2011) associated with the degradation of the P27^{kip1} protein. Our results contribute to the understanding of the mechanisms through which the ACTH and N-POMC peptides, both derived from a common precursor peptide, regulate the growth and maintenance of the adrenal cortex.

Funding

PORM is a recipient of scholarships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Foundation for the Support of Research in the State of São Paulo); CFPL received funding from FAPESP, from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, the National Council

Fig. 6. Proposed model for the signaling events triggered by N-POMC_{1–28} during the G1–S transition in the rat adrenal cortex. ERK 1/2: extracellular signal-related kinases 1 and 2; ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculata; ZR: zona reticularis; cell cycle phases Gap 0 (G0), Gap 1 (G1), and synthesis (S).

for Scientific and Technological Development) and from the Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (University of São Paulo Dean's Office for Research Projects).

Acknowledgements

The authors are thankful to Dr. Maria Aparecida Juliano from the Department of Biochemistry and Biophysics at the Federal University of São Paulo (UNIFESP) for the synthesis of the modified N-POMC^{Met} peptide and Dr. Marina Martinez from the Laboratory of Clinical Pathology at the University Hospital from the University of São Paulo (USP) for the ACTH assay in rat plasma.

References

- Baccaro, R.B., Mendonca, P.O., Torres, T.E., Lotfi, C.F., 2007. Immunohistochemical Jun/Fos protein localization and DNA synthesis in rat adrenal cortex after treatment with ACTH or FGF2. *Cell Tissue Res.* 328, 7–18.
- Boyle, B., Butz, H., Liko, I., Zalatnai, A., Toth, M., Feldman, K., Horanyi, J., Igaz, P., Racz, K., Patocs, A., 2010. Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. *Steroids* 75, 695–700.
- Ciemerych, M.A., Kenney, A.M., Sicinska, E., Kalaszczyńska, I., Bronson, R.T., Rowitch, D.H., Gardner, H., Sicinski, P., 2002. Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Develop.* 16, 3277–3289.

- Coulter, C.L., Pestell, R.G., Ross, J.T., Salkeld, M.D., James, S., Bennett, H.P., McMillen, I.C., 2002. Effect of N-proopiomelanocortin (1–77) and (1–49) infusions on adrenal expression of cyclin D1 in the fetal sheep. *Endocr. Res.* 28, 625–629.
- Dumitrescu, A., Aberdeen, G.W., Pepe, G.J., Albrecht, E.D., 2007. Developmental expression of cell cycle regulators in the baboon fetal adrenal gland. *J. Endocrinol.* 192, 237–247.
- Estivariz, F.E., Iturriza, F., McLean, C., Hope, J., Lowry, P.J., 1982. Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides. *Nature* 297, 419–422.
- Estivariz, F.E., Carino, M., Lowry, P.J., Jackson, S., 1988. Further evidence that N-terminal pro-opiomelanocortin peptides are involved in adrenal mitogenesis. *J. Endocrinol.* 116, 201–206.
- Inaba, T., Matsushima, H., Valentine, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J., Look, A.T., 1992. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* 13, 565–574.
- King, P., Paul, A., Laufer, E., 2009. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *PNAS* 106, 21185–21190.
- Kitagawa, K., Kotake, Y., Kitagawa, M., 2009. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. *Cancer Sci.* 100, 1374–1381.
- Kobayashi, H., Kambe, F., Imai, T., Hibi, Y., Kikumori, T., Ohmori, S., Nakao, A., Seo, H., 2006. Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p27Kip1 and p57Kip2, by corticotropin in rat adrenal cortex. *J. Endocrinol.* 189, 671–679.
- Lotfi, C.F., Lepique, A.P., Forti, F.L., Schwindt, T.T., Eichler, C.B., Santos, M.O., Rebutini, I.T., Hajj, G.N., Juliano, L., Armelin, H.A., 2000. Proliferative signaling initiated in ACTH receptors. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 33, 1133–1140.
- Lowry, P.J., Silas, L., McLean, C., Linton, E.A., Estivariz, F.E., 1983. Pro-gamma-melanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth. *Nature* 306, 70–73.
- Mattos, G., Jacysyn, J., Amarante-Mendes, G., Lotfi, C., 2011. Comparative effect of FGF2, synthetic peptides 1–28 N-POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures. *Cell Tissue Res.* 345, 343–356.
- McLean, C., Hope, J., Salacinski, P., Estivariz, F., Lowry, P.J., 1981. Purification and characterization of amino-terminal pro-opiomelanocortin peptides from human pituitary glands. *Biosci. Rep.* 1, 843–849.
- Mendonca, P.O.R.D., Lotfi, C.F.P., 2011. The proliferative effect of synthetic N-POMC_{1–28} peptides in rat adrenal cortex: a possible role for cyclin E. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 156–161.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y., Nakayama, K.-I., 1996. Mice lacking P27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707–720.
- Pepper, D.J., Bicknell, A.B., 2009. The stimulation of mitogenic signaling pathways by N-POMC peptides. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300, 77–82.
- Pestell, R.G., Albanese, C., Reutens, A.T., Segall, J.E., Lee, R.J., Arnold, A., 1999. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr. Rev.* 20, 501–534.
- Ray, A., James, M.K., Larochelle, S., Fisher, R.P., Blain, S.W., 2009. P27^{Kip1} inhibits cyclin D-Cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes. *Mol. Cell. Biol.* 29, 986–999.
- Schwindt, T.T., Forti, F.L., Juliano, M.A., Juliano, L., Armelin, H.A., 2003. Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. *Biochemistry* 42, 2116–2121.
- Torres, T.E., Lotfi, C.F., 2007. Distribution of cells expressing Jun and Fos proteins and synthesizing DNA in the adrenal cortex of hypophysectomized rats: regulation by ACTH and FGF2. *Cell Tissue Res.* 329, 443–455.
- Torres, T.E., de Mendonca, P.O., Lotfi, C.F., 2010. Synthetic modified N-POMC(1–28) controls in vivo proliferation and blocks apoptosis in rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res.* 341, 239–250.
- Watanabe, G., Lee, R.J., Albanese, C., Rainey, W.E., Batlle, D., Pestell, R.G., 1996. Angiotensin II activation of cyclin D1-dependent kinase activity. *J. Biol. Chem.* 271, 22570–22577.
- Xiong, Y., Connolly, T., Fletcher, B., Beach, D., 1991. Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691–699.

APÊNDICE D - Esquemas de conclusões

Inibição dos peptídeos hipofisários (DEX)

ACTH