Ismael Cabral Costa

**Caracterização e efeitos do ACTH nas células progenitoras
do córtex adrenal durante sua regeneração em animais
UbiquitinaC-Cre/ERT² *Pomc*^{Flox/Flox}**

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

São Paulo
2016

Ismael Cabral Costa

**Caracterização e efeitos do ACTH nas células progenitoras
do córtex adrenal durante sua regeneração em animais
UbiquitinaC-Cre/ERT² *Pomc*^{Flox/Flox}**

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Prof^a. Dr^a Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

São Paulo
2016

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

© reprodução total

Costa, Ismael Cabral.

Caracterização e efeito do ACTH nas células progenitoras do córtex adrenal durante sua regeneração em animais UbiquitinaC-Cre/ERT2 *Pomc Flox Flox* / Ismael Cabral Costa. – São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lofti.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Análise da expressão gênica de células progenitoras do córtex adrenal.

Versão do título para o inglês: Characterization and effect of ACTH in progenitor cells of the adrenal cortex during regeneration in UbiquitinC-Cre/ERT2 *Pomc Flox Flox* animals.

1. Glândula adrenal animal 2. Peptídeos 3. ACTH 4. *Pomc* 5. Células progenitoras 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/SBIB0117/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ismael Cabral Costa.

Título da Dissertação: Caracterização e efeito do ACTH nas células progenitoras do
córTEX adrenal durante sua regeneração em animais UbiquitinaC-
Cre/ERT2 Pomc *Flox Flox*.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

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 **91** nas fls. **03** do livro **10** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Claudimara Ferini Pacicco Lotfi** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*O papel dos peptídeos derivados da POMC na diferenciação e função do córtex adrenal*" do qual participam o(s) aluno(s) **Pedro Omari Ribeiro de Mendonça, Ismael Cabral Costa**, 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 **19.08.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 19 de agosto de 2013.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Aos meus pais, Lidia e Gilberto

Aos meus irmãos, Isaque e Tunay Lucas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS

À minha mãe, Giba e meus irmãos pelo amor incondicional e apoio.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Claudimara Lotfi, pela oportunidade, ensinamentos e pela paciência...muita paciência mesmo. Obrigado

Ao laboratório do Prof^o Dr^o Chin Jia Lin, em especial a Natalia Gomes pelo suporte e orientação com a técnica de microdissecção.

Ao laboratório do Prof^o Dr^o Jackson Cioni, pelo uso do criostato.

Aos meus amigos de laboratório, Barbara Passaia, Barbara Conceição, Isadora e Thaís, minha companheira de biotério. Obrigado pelo apoio, conselhos e risadas, com vocês tudo ficou mais leve.

Ao meu amigo Pedro Omori, pelo suporte, sugestões e ajuda.

Aos meus amigos da vida, Gisele, Aline, Max, Dani, Leine, Juliana, Carolyn, Thaís, Alex, André, Rodrigo, Luciano, Karina, Bruno, Christiane, Zé, Mendieta, e vários outros. Pelos momentos alegres e apoio.

Aos colegas do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III, pela ajuda e trocas de experiências.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas III, pelo suporte.

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo investimento financeiro.

Aos animais de experimentação.

“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de coração...”.

Colossenses 3:23

RESUMO

COSTA, I. C. **Caracterização e efeito do ACTH nas células progenitoras do córtex adrenal durante sua regeneração em animais UbiquitinaC-Cre/ERT² *Pomc*^{Flox/Flox}**. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Estudos com animais (*Pomc*^{-/-}) demonstraram que os animais que sobrevivem à fase adulta apresentam obesidade, defeitos na pigmentação e insuficiência adrenal severa, refletindo a dependência dos peptídeos derivados da POMC para o desenvolvimento e manutenção da adrenal. O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é considerado o principal fator derivado da POMC atuante na glândula adrenal, seja no desenvolvimento, manutenção ou corticosteroidogênese. Há evidências na literatura que demonstram a existência de células indiferenciadas na cápsula adrenal, onde estas seriam responsáveis pela manutenção e regeneração do córtex adrenal, e que o ACTH poderia estimular estas células à proliferarem e se diferenciarem. No entanto, não se sabe quais são as vias de sinalização e os genes que são modulados em decorrência dessa sinalização e que desencadeiam esta resposta. Através de animais que possuem um sistema "knock-out" condicional Cre-Lox induzível por Tamoxifeno, silenciámos o gene *Pomc* em camundongos adultos e avaliamos o efeito do ACTH nessas células. Caracterizamos o modelo animal através da análise dos genótipos, peso corpóreo, ingestão de alimento, quantificação do ACTH plasmático e análise microscópica da glândula adrenal. Foram utilizados animais tratados com ACTH₁₋₃₉ por 1 ou 2 horas, ou com solução salina antes da eutanásia. Foram utilizadas placas de PCR array para detecção de genes que caracterizam células progenitoras para análise com amostras de cDNA da região mais externa do córtex adrenal obtidas pela técnica de "rolamento". Além disso, genes modulados pelo ACTH foram validados por qPCR em amostras microdissecadas da zona capsular/subcapsular da adrenal. Após caracterização do modelo de silenciamento condicional do gene *Pomc*, os resultados da ação do ACTH mostraram aumento da expressão de genes relacionados com as vias *Wnt*, *Igf1* e *Notch*. Esses dados corroboram evidências descritas na literatura que mostram a importância dessas vias no desenvolvimento e manutenção do córtex adrenal, e sugerem o envolvimento do ACTH nesses processos que envolvem as células progenitoras do córtex adrenal.

Palavras-chave: Glândula adrenal animal. Peptídeos. ACTH. *Pomc*. Células progenitoras.

ABSTRACT

COSTA, I. C. **Characterization and effect of ACTH in progenitor cells of the adrenal cortex during regeneration in UbiquitinC-Cre/ERT2 POMC Flox / Flox animals.** 2016. 73 f. Master thesis (Sciences Morphofunctional) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, 2016.

Studies with *Pomc* knock-out (KO) mice demonstrated that animals which survive to adulthood present obesity, severe defects in pigmentation and adrenal insufficiency, reflecting the dependency of POMC derived peptides for the development and maintenance of the adrenal gland. The adrenocorticotrophic hormone (ACTH) is considered the main hormone derived from POMC that acts in the development, maintenance and steroidogenesis in the adrenal gland. There is evidence in the literature demonstrating the existence of stem cells in the adrenal capsule, where they would be responsible for the maintenance and regeneration of the adrenal cortex, and that ACTH could stimulate these cells to proliferate and differentiate. However, it remains unknown what signaling pathways and genes that are triggered and modulated as a result of this stimulus. By using animals with a Cre-Lox system conditionally inducible by tamoxifen, we KO *Pomc* gene in adult mice and evaluated the effect of ACTH in the capsular stem cells. The animal model was characterized by genotype, measures of body weight and food intake, quantification of plasmatic ACTH and microscopic analysis of the adrenal gland. Animals were treated with ACTH₁₋₃₉ for 1 or 2 hours, or saline prior to euthanasia. PCR array was performed to detect the expression level of genes that characterize stem cells using as template cDNA samples from the outermost region of the adrenal cortex obtained by the technique of "rolling bearing". In addition, genes modulated by ACTH were validated by qPCR using as template cDNA samples from microdissected capsular / subcapsular areas from adrenal gland. After characterization of the conditional *Pomc* KO model, the results show that ACTH increased expression of genes related to Wnt, Igf1 and Notch pathways. These data corroborate with the literature showing the importance of these pathways in the development and maintenance of the adrenal cortex, and suggesting a role of ACTH in these processes involving progenitor cells of the adrenal cortex.

Keywords: Animal adrenal gland. Peptides. ACTH. *Pomc*. Progenitor cells

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem ilustrativa da glândula adrenal.	17
Figura 2 - Eixo HPA que mostra o efeito de retroalimentação negativa.	18
Figura 3 - Processamento da pró-opiomelanocortina (POMC) nos lobos anterior e intermediário da hipófise e o papel fisiológico dos peptídeos resultantes das clivagens.	20
Figura 4 - Esquema representativo dos nichos de células progenitoras na região capsular da adrenal.	23
Figura 5 - Silenciamento induzível do gene <i>Pomc</i> por Tamoxifeno.	27
Figura 6 - Esquema representando a linha de tempo para a análise de peso corpóreo e ingestão de alimentos dos animais experimentais e controles.	30
Figura 7 - Imagem representativa da placa de PCR utilizada.	34
Figura 8 - Figura representativa do corte histológico da glândula adrenal corado com Cresil Violeta.	36
Figura 9 - Gráficos do Bioanalyzer.	38
Figura 10 - Fotos representativas da caracterização genotípica das linhagens.	40
Figura 11 - Concentração plasmática do ACTH nos animais <i>Cre Pomc^{Flox/Flox}</i> tratados com Tamoxifeno (25 mg/mL) por 5 dias e corticosterona (25 µg/mL).	41
Figura 12 - Peso e ingestão de alimentos em animais <i>Cre Pomc^{Flox/Flox}</i> com reposição de corticosterona.	42
Figura 13 - Análise microscópica da glândula adrenal.	43
Figura 14 - Concentração plasmática do ACTH nos animais <i>Cre Pomc Flox/Flox</i> tratados com Tamoxifeno (25 mg/mL) por 5 dias.	44
Figura 15 - Análise do peso corpóreo dos animais tratados com Tamoxifeno (25 mg/mL) por 5 dias.	45
Figura 16 - Análise comparativa do consumo alimentar dos animais antes e após tratamento com Tamoxifeno.	45
Figura 17 - Análise microscópica da glândula adrenal.	46
Figura 18 - Expressão gênica em animais ACTH 1 h comparados com Salina 1 h.	47
Figura 19 - Expressão gênica em animais ACTH 2 hs comparados com Salina 2 hs.	50
Figura 20 - Expressão gênica em animais ACTH 1h comparados com ACTH 2hs.	52

Figura 21 - Expressão relativa dos genes <i>Igf1</i> e <i>Wnt1</i> em animais tratados por 1 h com ACTH (ACTH1h) comparados com animais tratados com solução salina (Salina1h).	55
Figura 22 - Expressão relativa dos genes <i>Sox2</i> e <i>Cdh2</i> em animais tratados por 2 hs com (ACTH2h) comparados com animais tratados com solução salina (Salina2h)..	56
Figura 23 - Expressão relativa dos genes <i>Dtx1</i> e <i>Acan</i> em animais tratados por 2 hs com (ACTH2h) comparados com animais tratados por 1 h com ACTH (ACTH1h).	56
Figura 24 - Expressão relativa dos genes <i>Igf1</i> e <i>Wnt1</i> de animais Cre <i>Pomc</i> ^{Flox/Flox} tratados com 1 h de ACTH (ACTH1h) e animais tratados com salina por 1 hora (Salina1h), obtido de material microdissecado.	57
Figura 25 - Expressão relativa dos genes <i>Sox2</i> e <i>Cdh1</i> de animais Cre <i>Pomc</i> ^{Flox/Flox} tratados com 2 hs de ACTH (ACTH2h) e animais tratados com salina por 2 hs (Salina2h), obtido de material microdissecado.....	58
Figura 26 - Expressão relativa dos genes <i>Dtx1</i> e <i>Acan</i> de animais Cre <i>Pomc</i> ^{Flox/Flox} tratados com 1 h de ACTH (ACTH1h) e animais tratados com 2 hs de ACTH (ACTH2h), obtido de material microdissecado.....	58
Figura 27 - Gráfico representativo das interações entre os genes que tiveram sua expressão aumentada significativa.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos genes com a expressão aumentada após tratamento com ACTH por 1 h	48
Tabela 2 - Relação dos genes com expressão diminuída após tratamento com ACTH por 1h	48
Tabela 3 - Relação dos genes com expressão aumentada após tratamento com ACTH por 2 hs	50
Tabela 4 - Relação dos genes com expressão diminuída após tratamento com ACTH por 2 hs.	51
Tabela 5 - Relação dos genes com expressão aumentada entre animais ACTH 1h e ACTH 2 hs.	52
Tabela 6 - Relação dos genes com expressão diminuída entre animais ACTH 1h e ACTH 2 hs.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA – Análise de variância

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico

Cre – Enzima Cre recombinase

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay

ERT2 – Receptor de estrógeno

HPA – Eixo Hipotálamo-Hipofise-Adrenal

MC2R – Receptor de melanocortina tipo 2

PC – Pró-proteína convertases

POMC – Hormônio Pró-opiomelanocortina

TMX - Tamoxifeno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais utilizados	26
3.1.1 <i>Grupo experimental</i>	28
3.2 Caracterização dos animais	28
3.2.1 <i>Extração de DNA</i>	28
3.2.2 <i>Genotipagem da linhagem UBC-Cre/ERT2</i>	29
3.2.3 <i>Genotipagem da linhagem Pomc Flox/Flox</i>	30
3.2.4 <i>Análise do peso corpóreo e da ingestão de alimento</i>	30
3.2.5 <i>Concentração plasmática de ACTH</i>	31
3.2.6 <i>Análise microscópica das glândulas adrenais</i>	31
3.3- O silenciamento do gene Pomc e tratamento com ACTH.....	31
3.4 Separação da cápsula e da região da subcapsula pela técnica de rolamento.....	32
3.5 Extração de RNA por TRIzol	32
3.6 PCR array	33
3.7 Preparação das secções das glândulas adrenais em criostato	34
3.8 Microdissecção a laser	35
3.9 Extração e quantificação do RNA do tecido microdissecado.....	36
3.10 qPCR.....	38
3.11 Análise estatística	39
4 RESULTADOS.....	40

4.1 Caracterização dos genótipos dos camundongos UBC-Cre/ERT² e <i>Pomc</i>^{Flox/Flox} e das linhagens obtidas <i>Cre Pomc</i>^{Flox/Flox}, <i>Cre Pomc</i>^{Flox/+} e <i>Pomc</i>^{Flox/Flox}	40
4.2 Caracterização dos animais <i>Cre Pomc</i>^{Flox/Flox} que tiveram ou não reposição de corticosterona	41
4.2.1 Resultados da caracterização dos animais tratados com corticosterona	41
4.2.1.1 A concentração plasmática do ACTH circulante.....	41
4.2.1.2 Análise do peso corpóreo e da ingestão de alimento.....	42
4.2.1.3 Análise microscópica das glândulas adrenais	43
4.2.2 Caracterização dos animais <i>Cre Pomc</i>^{Flox/Flox} sem reposição de corticosterona	44
4.2.2.1 A concentração plasmática do ACTH circulante.....	44
4.2.2.2 Análise do peso corpóreo e da ingestão de alimento.....	44
4.2.2.3 Análise microscópica das glândulas adrenais	46
4.3 Análise da expressão gênica dos animais <i>Cre Pomc</i>^{Flox/Flox} por PCR array	46
4.3.1 Análise da expressão gênica dos animais <i>Cre Pomc</i>^{Flox/Flox} tratados por 1 h com ACTH	47
4.3.2 Análise da expressão gênica dos animais <i>Cre Pomc</i>^{Flox/Flox} tratados por 2 hs com ACTH	49
4.3.3 Comparação da análise da expressão gênica dos animais <i>Cre Pomc</i>^{Flox/Flox} tratados por 1 h e 2 hs com ACTH	51
4.3.4 Validação da expressão dos genes modulados após tratamento com ACTH	55
4.4 Análise da expressão dos genes modulados por 1 h e 2 hs de ACTH de amostras obtidas por microdissecção.	57
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A glândula suprarrenal situa-se sobre o polo superior de cada rim em humanos, e no polo cranial em murinos. É um órgão cuja irrigação sanguínea em murinos ocorre pela artéria suprarrenal superior, ramo da aorta abdominal, e da artéria suprarrenal inferior, ramo da artéria renal. As ramificações dessas artérias formam uma rede de vasos arteriais na região subcapsular, responsável pela irrigação das zonas mais internas do córtex e da região central, a medula adrenal. A suprarrenal é revestida por uma cápsula conjuntiva e internamente a essa cápsula observamos dois tecidos com funções e origens embriológicas diferentes: o tecido cortical ou córtex adrenal e o tecido medular.

As células do córtex adrenal são de origem mesodérmica, e juntas formam três tipos celulares diferentes que divide o córtex adrenal em três zonas concêntricas, denominadas de zona Glomerulosa, zona Fasciculada e zona Reticulada (Figura 1). A zona Glomerulosa é a porção mais externa do córtex adrenal, sendo uma região adjacente com a zona capsular da glândula. Essa zona Glomerulosa é formada por grupos arredondados de células disposta paralelamente, com formato cilíndrico e núcleos esféricos, responsáveis pela produção e secreção de mineralocorticoides, como a aldosterona que está associada com a homeostase de eletrólitos circulante. A zona mais intermediária e maior do córtex adrenal é denominada de zona Fasciculada, essa região é formada por células poliédricas com grande quantidade de gotículas lipídicas, sua organização é feita em colunas intercaladas com capilares, paralelas perpendicularmente à superfície da glândula. Essa zona regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é responsável pela produção e secreção de glicocorticoides, como o cortisol em humanos e a corticosterona em murinos, esses hormônios estimulam a gliconeogênese, inibe a utilização de glicose pelos tecidos periféricos, aumentam a síntese de glicogênio e o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. A terceira e mais interna zona do córtex adrenal, denominada de zona Reticulada é formada por células menores em comparação com as demais zonas, que formam uma estrutura tridimensional em forma de redes entrelaçadas. Essa zona, em humanos sintetiza e secreta hormônios andrógenos e estrogênios, porém em murinos pela ausência da enzima citocromo P450 17- α -hidroxilase esses tipos de hormônios sexuais não são sintetizados, desse

modo assim como ocorre na zona Fasciculada essa região secreta corticosterona (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; LE GOASCOGNE et al., 1991).

A medula da glândula adrenal tem como origem as células da crista neural, ou seja, da neuroectoderme. É constituída de células em formato poliédrico, arranjadas em grupos que rodeiam capilares e vênulas, essas células são chamadas de cromafins. Essa região tem como função a produção e secreção de adrenalina (epinefrina) e noradrenalina (norepinefrina) após estímulos nervosos. Esses dois hormônios são estruturalmente similares e estão relacionados com reações de luta e fuga (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 1 - Imagem ilustrativa da glândula adrenal. Secção longitudinal que indica localização da cápsula, do córtex e da medula. Adaptado de Anatomy of Adrenal Gland by Stocktrek Images, 2013.

A produção e secreção dos glicocorticoides é controlada pelo eixo HPA (Hipotálamo-Hipófise-Adrenal) (Figura 2). 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 corticotrofos, localizados na adeno-hipófise, a produzir e liberar o ACTH. Este hormônio é reconhecido por receptores específicos presentes nas células do córtex adrenal, chamado de receptor de melanocortina do tipo 2 (MC2R), que, uma vez ativados, desencadeiam uma sinalização para a produção de corticosteroides. No homem altas concentrações de cortisol na corrente

sanguínea chegam ao hipotálamo e à adeno-hipófise e inibem, respectivamente, a produção de CRH e de ACTH. Este efeito de retroalimentação negativa deprime o eixo HPA (para revisão, PAPADIMITRIOU; PRIFTIS, 2009).

Figura 2 - Eixo HPA que mostra o efeito de retroalimentação negativa. CRH: Hormônio liberador de corticotropina; ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico. Adaptado de corticoides.wordpress.com

O ACTH é um hormônio de cadeia simples sintetizado pela hipófise, é formado por 39 aminoácidos, que provém de uma molécula maior, o pró-hormônio denominado Pró-opiomelanocortina (POMC). Uma vez sintetizado e liberado na corrente sanguínea o ACTH irá se ligar nos receptores de melanocortina tipo 2 (MC2R) localizados na glândula adrenal. Esse receptor é uma proteína transmembrânica de sete hélices associada a uma proteína G (XING, et al., 2010), que uma vez ativada, aumenta a concentração intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), que por sua vez ativa a via da proteína PKA promovendo modulações na expressão gênica das células, estimulando assim a esteroidogênese (SIMPSON; WATERMAN, 1998). Essa ação esteroidogênica do ACTH no córtex suprarrenal está bem estabelecida (SCHIMMER, 1980), no entanto, ainda é motivo de discussão o efeito do ACTH na manutenção do córtex, isto é, no equilíbrio entre a proliferação, diferenciação e morte celular. Estudos demonstraram 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 que utilizaram ratos perfundidos com anticorpo anti-ACTH para neutralizar o ACTH circulante, mostraram redução nos níveis de esteroides, mas não uma atrofia da glândula adrenal. Essas evidências sugerem que outros peptídeos derivados do mesmo pró-hormônio precursor denominado de POMC possam atuar na manutenção da glândula adrenal (ESTIVARIZ et al., 1982; RAO et al., 1978).

A POMC é um pró-hormônio de 241 aminoácidos no homem produzido principalmente pela hipófise que, após processamento pós-traducional em sítios específicos, resulta na produção de vários peptídeos menores (Figura 3).

Figura 3 - Processamento da pró-opiomelanocortina (POMC) nos lobos anterior e intermediário da hipófise e o papel fisiológico dos peptídeos resultantes das clivagens. ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico; CLIP: Peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotropina; LPH: Lipotropina; MSH: Hormônio estimulador de melanócitos; N-POMC: Peptídeos N-terminais da POMC. Adaptado de BICKNELL, 2008.

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 produzido o 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 chamado 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). Enquanto o ACTH é absolutamente necessário para a corticosteroidogênese, os peptídeos N-POMC podem potencializar a ação esteroidogênica do ACTH e também estimular o crescimento adrenal (PEDERSEN; BROWNIE, 1980; PEDERSEN et al., 1980).

Estudos com animais "knockout" para o gene *Pomc* (*Pomc*^{-/-}) descreveram que, apesar do nascimento desses animais seguir uma frequência mendeliana, três quartos dos animais morrem logo após o nascimento. Além disso, os animais que sobreviveram à fase adulta apresentaram obesidade, defeitos na pigmentação e insuficiência adrenal severa (YASWEN, et al., 1999). Em humanos, foram descritas mutações no gene *POMC*, que causam falta parcial ou total dos peptídeos derivados da POMC na circulação. Esse quadro levou à uma adrenal hipoplásica, falta de corticosteroides circulantes, obesidade e deficiência na pigmentação da pele e do cabelo (KRUDE, et al., 1998).

Em relação à formação da glândula adrenal, foi demonstrado que, em animais *Pomc*^{-/-} neonatos, a glândula estava macroscopicamente presente, entretanto a arquitetura do córtex era diferente do selvagem, com atrofia da zona Fasciculada. Decorridos cinco semanas após o nascimento, foi observada uma atrofia severa de todo o órgão, sugerindo uma dependência dos peptídeos derivados da POMC para a maturação e manutenção da adrenal (KARPAC, et al., 2005).

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 é que as células menos

diferenciadas estão localizadas tanto na cápsula quanto na região subcapsular, ou mesmo entre as células que compõem a zona Glomerulosa da glândula.

Células-tronco são as primeiras células que surgem na estruturação de um novo organismo. São indiferenciadas, ou seja, têm plena capacidade de se diferenciarem em qualquer outro tipo de célula, assim atuam como um verdadeiro sistema reparador do corpo, fazendo a substituição de células ao longo de toda a vida de um organismo (MARQUES, 2006). Geralmente são células com baixa taxa metabólica e que raramente entram no ciclo celular para a divisão. Quando isso ocorre, geralmente é em resposta à algum dano ou perda tecidual, por apresentarem grande potencial para regeneração do tecido. Além disso, as células-tronco estão em um ambiente definido, que pode ser chamado de nicho de células-tronco que podem interagir entre si, sendo que essa característica pode ter um impacto significativo sobre o seu destino (GHAFARI, 2011).

Existem evidências que indicam a região capsular da adrenal como um nicho de células mais indiferenciadas, e que seria a região responsável por exercer um papel importante no desenvolvimento da glândula (KIM; HAMMER, 2007; WOOD et al., 2013) (Figura 4). Esse nicho capsular serve tanto para recrutar células indiferenciadas para o desenvolvimento da glândula, como também para regular o destino dessas células-tronco durante a vida do organismo (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004; WHETTON; GRAHAM, 1999). Essa regulação ocorre em resposta a várias sinalizações morfogênicas relacionadas à expressão dos genes *Wnt*, *Shh* e *Notch* (KIM, et al., 2009). A região subcapsular, por apresentar grande número de mitoses, seria o local das células progenitoras, resultado de uma divisão assimétrica das células da região capsular, sendo assim teria um papel na manutenção e renovação do córtex adrenal (KIM; HAMMER, 2007). Alguns dados (KIM; HAMMER, 2007; PIGNATELLI, et al., 2002; ZAJICEK; ARIEL; ARBER, 1986) apoiam essa hipótese, pois a glândula adrenal adulta mantém a homeostase do órgão por reposição de células do córtex adrenal ao longo de toda a vida do organismo. Estes estudos, que utilizam técnicas histológicas e marcadores de proliferação, forneceram evidências de que as células da região capsular e subcapsular da adrenal são centripetamente deslocadas, para repovoar o córtex adrenal. Além disso, existem estudos que mostram que, mesmo quando removido todo o córtex adrenal com a manutenção das regiões capsular e subcapsular, chamado de enucleação adrenal, o córtex adrenal se regenera (KIM et al., 2009; PERRONE; BENGELE; ALEXANDER,

1986; SKELTON, 1959). Portanto, há uma série de evidências que sugerem a existência de células-tronco ou progenitoras na glândula adrenal (HUANG et al., 2010; KIM; HAMMER, 2007; KIM et al., 2009; WOOD et al., 2013).

Figura 4 - Esquema representativo dos nichos de células progenitoras na região capsular da adrenal. A: Imunohistoquímica anti-PCNA, mostrando células em proliferação. B: Imunofluorescência para Gli1, marcação positiva na região capsular. Adaptado de KIM et al 2009 e WOOD et al, 2013

Entretanto, apesar das evidências de que o ACTH possa estimular estas células à proliferarem e se diferenciarem (PIGNATELLI et al., 2002), ainda não são conhecidos os mecanismos, isto é, as vias de sinalização e os genes que são modulados em decorrência dessa sinalização, e que desencadeiam esta resposta. Investigações sobre como o ACTH desencadeia esses fenômenos são essenciais para a compreensão de como ocorre a reposição celular do córtex adrenal. Além disso, o entendimento de como as células-tronco ou progenitoras adrenais respondem ao ACTH poderá futuramente contribuir para o tratamento de patologias que são causadas pela alteração anormal das vias que controlam a manutenção e função do córtex adrenal.

Portanto, temos como hipótese que a administração do ACTH possa reverter, pelo menos parcialmente, a atrofia causada pela ausência dos peptídeos derivados da *Pomc* nos animais *Pomc*^{-/-} através da ativação e da diferenciação das células-tronco / progenitoras localizadas na região da cápsula e subcápsula, e que estes fenômenos são intermediados pela modulação da expressão de genes-chaves. Portanto, para testar essa hipótese tivemos como objetivo nesse trabalho determinar

um perfil transcricional da região capsular e sub-capsular do córtex adrenal, prováveis nichos de células-tronco-progenitoras utilizando animais que possuam um sistema Cre-Lox induzível para silenciar o gene *Pomc*, e portanto, silenciar o eixo HPA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil transcricional das células-tronco / progenitoras da região capsular e subcapsular do córtex adrenal após silenciamento do gene *Pomc* e inibição do eixo HPA em camundongos adultos Cre *Pomc^{Flox/Flox}* induzíveis tratados com ACTH.

2.2 Objetivos Específicos

- Contribuir para o estabelecimento e padronização do modelo animal de indução do silenciamento do gene *Pomc* por Tamoxifeno, através da quantificação do ACTH plasmático, quantificação do peso corpóreo e da ingestão de alimentos e análise microscópica das glândulas adrenais, em animais com e sem reposição de corticosterona
- Ajustar e padronizar o protocolo de separação da zona mais externa da glândula adrenal por técnica de “rolamento”
- Estabelecer e padronizar o protocolo de microdissecção a laser das porções de interesse da glândula, com a colaboração da equipe do Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, supervisionado pelo Prof. Dr. Chin Jia Lin;
- Analisar o perfil de expressão de 84 genes relacionados à identificação, proliferação e diferenciação de células-tronco de camundongos nas regiões capsulares e sub-capsulares de adrenais desses animais sobre efeito do ACTH.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados

O modelo experimental utilizado para desenvolver este projeto é baseado no sistema "knock-out" condicional por Cre-Lox em camundongos (Figura 5). Foram utilizados camundongos geneticamente modificados portadores do gene *Pomc* flanqueado por sequências *LoxP* em homozigose desenvolvidos pela equipe do Dr. Bradford Lowell (Beth Israel Deaconess Medical Center - Harvard Medical School - Boston, MA EUA) e gentilmente doados ao nosso laboratório. Estes animais foram cruzados com camundongos que possuem a enzima Cre transcrita sob controle de um promotor do gene da Ubiquitina C, que é expresso em todos os tecidos do animal, e pode ser ativado por Tamoxifeno. Esses animais estão disponíveis comercialmente [linhagem B6.Cg-Tg(UBC-Cre/ERT²)1Ejb/J] e foram adquiridos da Jackson Laboratories (Bar Harbour - ME EUA). Neste sistema de silenciamento gênico, a região codificadora de Cre é fusionada com o domínio de ligação do receptor de estrógeno humano (ERT²). Este domínio possui três mutações pontuais, tornando o receptor não responsivo ao ligante natural estradiol. A proteína fusionada Cre é constitutivamente expressa em todos os tipos celulares por meio do promotor do gene da Ubiquitina C, entretanto mantém-se inativa devido à interação com as proteínas "Heat Shock" (HSP90). As proteínas "heat shock" interferem com a atividade da recombinase Cre-ERT² que se torna ativo quando o ligante 4-OH-tamoxifeno (TMX) está presente e promove a dissociação das proteínas HSP90 do complexo. Após dissociação, a proteína Cre-ERT² fusionada é liberada do complexo e promove a excisão do segmento de DNA contendo o exon 3, região codificadora do gene *Pomc* flanqueado por sítios *LoxP*.

Através do cruzamento dessas duas linhagens obtivemos os animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} que pode ter o controle da expressão do gene *Pomc*, isto é, uma diminuição da expressão desse gene na fase adulta por meio da administração de Tamoxifeno. Foram obtidos também animais *Pomc*^{Flox/Flox} utilizados como controle experimental do modelo animal e também tratados com Tamoxifeno. Os animais gerados de cada grupo foram monitorados quanto ao genótipo através da utilização de "primers" específicos e por reação em cadeia da polimerase (PCR). Portanto, os animais foram separados conforme o genótipo determinado, não sendo

necessariamente da mesma prole. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICB), registrado com n° de protocolo 91, nas folhas 03 do livro 10.

Figura 5 - Silenciamento induzível do gene *Pomc* por Tamoxifeno.

3.1.1 Grupo experimental

Nesse projeto utilizamos 6 grupos experimentais com cinco animais cada, são animais com genótipo Cre *Pomc*^{Flox/Flox} e *Pomc*^{Flox/Flox}, adultos, machos e que foram tratados com Tamoxifeno por 5 dias para a diminuição da expressão do gene *Pomc*.

Grupo 1: Animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} com reposição de corticosterona, tratados com ACTH¹⁻³⁹ 2 horas antes da eutanásia (CPFF+C)

Grupo 2: Animais *Pomc*^{Flox/Flox} sem reposição de corticosterona (PFF)

Grupo 3: Animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} sem reposição de corticosterona, tratados com ACTH¹⁻³⁹ 1 hora antes da eutanásia (ACTH1h)

Grupo 4: Animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} sem reposição de corticosterona, tratados com Salina 1 hora antes da eutanásia (Salina1h)

Grupo 5: Animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} sem reposição de corticosterona, tratados com ACTH¹⁻³⁹ 2 horas antes da eutanásia (ACTH2h)

Grupo 6: Animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} sem reposição de corticosterona, tratados com Salina 2 horas antes da eutanásia (Salina2h)

3.2 Caracterização dos animais

A caracterização das linhagens de camundongos geneticamente modificados foi realizada através da análise do DNA genômico por reação de PCR, pela análise do peso corpóreo e da ingestão de alimentos, da quantificação do ACTH plasmático e pela análise microscópica e macroscópica das glândulas adrenais. Todas essas análises foram realizadas nos animais que receberam reposição de corticosterona, bem como nos animais sem reposição de corticosterona.

3.2.1 Extração de DNA

Após o desmame dos animais, aproximadamente três semanas após o nascimento, coletamos uma amostra da cauda de cada filhote para a extração do DNA utilizando o kit para genotipagem Extract-N-Amp Tissue PCR Kit (SIGMA, St.

Louis). As amostras da cauda foram incubadas com 100 µl do tampão de extração e 12,5 µl da solução de preparo do tecido, e centrifugadas à 10000 rpm por 1 min a 22 °C. Em seguida a solução foi incubada por 20 min a 22 °C. Para a segunda etapa de digestão as amostras foram colocadas em banho seco (Labnet-Accublock digital Dry Bath) por 12 min a 94 °C, seguido da adição de 50 µl de solução neutralizadora. As amostras foram homogeneizadas e para a estabilização da reação foram mantidas por 1 h a 4 °C.

3.2.2 Genotipagem da linhagem UBC-Cre/ERT2

O protocolo seguido foi conforme sugerido pelo fabricante do Kit Extract-N-Amp PCR Reaction Mix (SIGMA, St. Louis), e foram utilizados dois pares de primers (Invitrogen), um par de primers para a região da enzima recombinase Cre F-5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3'; R-5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT-3' e um par de primers para o controle interno F-5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'; R-5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'. As sequências dos primers foram obtidas segundo sugerido pela Jackson Laboratories. Para a reação em cadeia da polimerase foi utilizado 5,0 µl de Extract-N-Amp Reaction Mix, 0,125 µl de cada primer (50 µM), 3,5 µl de água DEPC e 1,0 µl do DNA extraído previamente. As amostras foram colocadas no termociclador (Eppendorf – Mastercycler EP Gradient S) com os seguintes parâmetros de reação: 1 x 94 °C por 3 min; 40 x 94 °C por 30 segundos para desnaturação, 52 °C por 30 segundos para anelamento, 72 °C por 1 min para extensão e 1 x 72 °C por 5 min extensão final. Após o término da reação foi adicionado 1 µl de gel loading buffer (Invitrogen – Blue Juice) para corar a amostra. Para a eletroforese foi feito um gel de agarose 1% com 2 µl SBYR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), 1 ml de TAE e 49 ml de água Milli-Q. Foram adicionados ao gel solidificado 20 µl de cada amostra, que migraram a 70 volts por aproximadamente 50 min.

3.2.3 Genotipagem da linhagem *Pomc* Flox/Flox

Foi utilizado o mesmo kit de genotipagem da outra linhagem de camundongos, 1 par de primers (Exxtend Biotecnologia, São Paulo), cuja sequência correspondeu à *Pomc* intron2 F2 (5'-GTCTTCTAGGTGTAGCTGCAC-3') e a outra foi correspondente à *Pomc* exon3 R1 (5'-GAGAGGTCGAGTTTGCAA-3'). Na reação em cadeia de polimerase foi utilizada 5,0 µl de Extract-N-Amp Reaction Mix, 0,125 µl de cada primer (50 µM), 3,75 µl de água DEPC e 1,0 µl do DNA extraído previamente. As amostras foram amplificadas com os seguintes parâmetros de reação: 1 x 94 °C 3:30 min; 40 x 94 °C por 30 segundos para desnaturação, 58 °C por 30 segundos para anelamento, 72 °C por 1 min para extensão e 1 x 72 °C por 4 min para extensão final. Após o término da reação as amostras foram analisadas em gel conforme descrito acima.

3.2.4 Análise do peso corpóreo e da ingestão de alimento

A avaliação do consumo alimentar bem como do peso corpóreo foi realizada 3 vezes por semana desde a idade aproximada de 50 dias, para todos os animais dos grupos experimentais (Figura 6).

Figura 6 - Esquema representando a linha de tempo para a análise de peso corpóreo e ingestão de alimentos dos animais experimentais e controles.

3.2.5 Concentração plasmática de ACTH

O sangue dos animais sacrificados, aproximadamente 200 µl, foi coletado em tubos de ensaio contendo EDTA (Microvette®, Sarstedt). Após transferência para microtubos a solução foi centrifugada 10 min; a 10000 rpm a 4 °C. Em seguida o sobrenadante foi coletado e estocado a -80 °C. Para quantificação do ACTH plasmático, foram utilizadas placas de ELISA de Ensaio Multiplex para ACTH de camundongo (Milliplex assay Multiplex; Merck/Millipore, Germany). Esse procedimento foi realizado pela Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas – LIM03, e feito por técnicos especializados nesse protocolo. Foram utilizados pelo menos 5 animais de cada genótipo. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.

3.2.6 Análise microscópica das glândulas adrenais

As glândulas suprarrenais retiradas dos animais foram fixadas em formaldeído 10% por 12 hs, seguida de desidratação em baterias de álcoois e inclusão em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 5 µm que foram montados em lâminas. Após passar por uma bateria de desparafinização, foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE).

3.3 O silenciamento do gene *Pomc* e tratamento com ACTH.

O silenciamento do gene *Pomc* é realizado em animais adultos machos, portanto com aproximadamente 60 dias, através da injeção intraperitoneal com Tamoxifeno (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) na concentração 25 mg/ml diluído em óleo de sésamo (Sigma). Foi administrado 100 µl por dia durante 5 dias consecutivos. Concomitante iniciamos em um grupo de animais tratados com Tamoxifeno a reposição da corticosterona (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) na água ingerida (25 µg/ml), para verificar a capacidade de sobrevivência desses animais

que tiveram o gene *Pomc* silenciado. Os animais foram mantidos por um período de 5 semanas. Após esse período tanto os animais com reposição de corticosterona, como os que não tiveram reposição de corticosterona, foram tratados com 100 µl de ACTH₁₋₃₉ sintético de rato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO EUA), através de uma injeção intraperitoneal única, na concentração de 10⁻⁹ M, e foram sacrificados após 1 ou 2 hs após o tratamento. Os animais controle foram tratados com solução salina pelo mesmo período. A eutanásia foi em guilhotina, e as glândulas adrenais e o plasma sanguíneo foram recolhidos para as análises.

3.4 Separação da cápsula e da região da subcapsula pela técnica de rolamento

A técnica de rolamento da glândula adrenal foi padronizada no nosso laboratório para a obtenção e separação dos diferentes tipos celulares que constituem o córtex adrenal para preparação de cultura de células primárias de adrenal de ratos (FRANÇA et al., 2015; MATTOS; LOTFI, 2005; MATTOS et al., 2011). As glândulas adrenais depois de retiradas foram mantidas em solução RNAlater® (Life Technologies) ou em solução tampão PBS estéril até serem levadas a uma lupa estereoscópica. Com a ponta do bisturi e ajuda de uma pinça de ponta fina foi feito um pequeno corte lateral no tecido, em seguida, com o próprio bisturi foram feitos movimentos de “rolamento” até a separação da cápsula do restante da glândula.

3.5 Extração de RNA por TRIzol

Imediatamente após a separação da cápsula, o material foi colocado em tubo de vidro com 1 mL de TRIzol para cada glândula adrenal, e macerado com um pistilo de teflon. A esse macerado foi adicionado 200 µl de clorofórmio seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a -4 °C. A parte aquosa (transparente) foi retirada e transferida para outro tubo aonde foi adicionado 500 µl de isopropanol, homogeneizado por vortex e centrifugado com os mesmos parâmetros anteriores. Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e foi acrescentado 1 mL de álcool 75% em cada amostra, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por

15 min a -4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo, em um papel limpo e seco. Após 20 min foi adicionado 20 µL de água RNA-free e amostra foi deixada “overnight” a 4 °C sob agitação. As amostras foram armazenadas a -80 °C.

3.6 PCR array

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total obtido das amostras utilizando o kit RT² First Strand (SABiosciences, Qiagen Company). Foram usados 504 ng de RNA total em 8 µl e através de enzimas fornecidas pelo kit e pelo método de transcriptase reversa foi obtido 111 µl de cDNA de cada amostra. Foram adicionados a 102 µl do cDNA sintetizado, 1,35 ml do reagente RT² SYBR Green Mastermix (SABiosciences, Qiagen Company), e 1,248 ml de água RNA-free. A placa utilizada foi a RT² Profiler™ PCR Array Mouse Stem Cell (PAMM-405Z, SABiosciences, Qiagen Company). A placa de PCR array contém 96 poços onde 84 poços possuem “primers” específicos de genes relacionados com a identificação de células tronco de camundongos, 5 poços são referentes a genes housekeeping: *β-actin*, *β2-microglobulin*, *Gapdh*, *Gusb* e *Hsp90*, 1 poço de controle genômico, 3 poços referentes a controle da transcriptase reversa e 3 poços de controle positivo da placa (Figura 7). Foram adicionados 25 µl do mix em cada poço, que foram selados com cap strips (fornecida pelo kit), após centrifugação de 1 min a temperatura ambiente, para eliminar possíveis bolhas. A reação foi realizada no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®) e os parâmetros utilizados foram 1x 10 min a 95 °C, 40 x 15 segundos a 95 °C seguido de 1 min a 60 °C. Os resultados das amplificações foram analisados automaticamente pelo programa do equipamento 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e posteriormente analisados quanto à variação da expressão de cada gene, em termos de vezes em relação ao controle, com a ajuda da plataforma GeneGlobe Data Analysis Center disponibilizado pelo fabricante das placas. Trata-se de um programa que realiza as análises dos dados fornecidos pelo equipamento de RT-PCR e os traduz em gráficos e planilhas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	GDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Housekeeping
genes

Genomic
DNA
control

Reverse
transcription
controls

Positive
PCR controls

Figura 7 - Imagem representativa da placa de PCR utilizada.

3.7 Preparação das secções das glândulas adrenais em criostato

A glândula adrenal esquerda dos animais eutanasiados foram congeladas em nitrogênio líquido logo após a retirada e transportadas em gelo seco até o criostato. O material congelado foi colocado em um suporte do criostato e incluída em O.C.T (Optimal Cutting Temperature – Tissue Plus, Fisher HealthCare, Houston, CA), que é um material composto de glicóis e solúvel em água que em temperatura menor ou igual a -10 °C se solidifica tornando possível a realização de secções. O criostato foi mantido numa temperatura de -23 °C para a realização dos cortes histológicos de 8 µm. Foram preparadas lâminas contendo 5 a 6 cortes que foram transportadas em gelo seco até o microscópio de microdissecção.

3.8 Microdissecção a laser

A técnica de microdissecção foi realizada no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Chin Jia Lin, no microscópio com Sistema PALM Microbeam IP Z, Carl Zeiss. Nesse microscópio o sistema emite luz de laser UV para o microscópio invertido através do canal de epifluorescência, que são convertidas em uma energia focal de alta densidade. O feixe de laser induz uma fotocomposição localizada (ablação fria), sem dano às estruturas adjacentes. Por causa da densidade de fótons reduzida do laser e por estar fora do intervalo do pico do comprimento das ondas de absorção para DNA, RNA ou proteínas, a luz do laser não focada não interfere com o material biológico. Uma vez que a área desejada é delimitada e cortada pelo laser, é usada a alta energia gerada pelo mesmo laser para catapultar (*Laser Pressure Catapulting*) os fragmentos selecionados para dentro de um recipiente. Com um único tiro de laser, a área dissecada é ejetada do plano do objeto e transportada à alta velocidade para o sistema coletor (tampa de um tubo tipo Eppendorf), contendo uma solução de captura [50 µl do tampão de lise RTL (Qiagen)]. Os cortes das lâminas foram corados com corante Cresil Violeta antes da microdissecção para auxiliar na identificação da região de interesse. Uma vez posicionada a lâmina no suporte do microscópio foram ajustados os parâmetros do laser para: Energia 68, Foco 80 e objetiva de 20 x para dar início a microdissecção. Após a coleta do material inicia-se o protocolo de extração de RNA total. Na Figura 8 observamos o corte histológico do animal, onde (A) representa o tecido intacto, (B) mostra a área delimitada para a microdissecção com o laser UV, (C) representa os pulsos que o laser emite para catapultar o material microdissecado e (D) o tecido já coletado.

Figura 8 - Figura representativa do corte histológico da glândula adrenal corado com Cresil Violeta (ampliado 20x). A: Tecido intacto. B: Área delimitada para microdissecção. C: Pontos de pulsos do laser UV. D: Tecido microdissecado e coletado. Parâmetros: Foco 80 e Energia 68.

3.9 Extração e quantificação do RNA do tecido microdissecado.

O RNA foi extraído com o kit comercial RNeasy® micro (Qiagen), que através de reações enzimáticas e uma coluna de sílica obteve-se 14 µl contendo o RNA total, que foi armazenado em -80 °C. Para o estabelecimento do protocolo de extração foi necessário a adição do reagente Additive RNAqueous Micro LCM (Ambion), para auxiliar o RNA na passagem pela coluna de sílica, e a não adição da DNase na reação, enquanto as demais instruções do kit foram seguidas. Para quantificar e analisar a qualidade do RNA extraído foi utilizado o kit Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Essa análise se baseia em um método de eletroforese que através de microchips sensoriais presente na placa de leitura, registra a fluorescência emitida pelas bandas do RNA, transformando-a em dados

numéricos e um gráfico. Antes de colocar as amostras na placa, é necessário preparar o gel de leitura das bandas (RNA 6000 Pico gel matrix, Agilent Technologies), onde foi acrescentado o corante (RNA 6000 Pico dye concentrate, Agilent Technologies). Cada placa contém 16 poços, onde 11 poços são para as amostras, 1 poço para o ladder (presente no kit), 1 poço para controle negativo e 3 poços para análise do gel de corrida. As amostras foram aplicadas no gel homogeneizado com o corante, o marcador negativo (RNA 6000 Pico Conditioning Solution, Agilent Technologies), e o marcador padrão (RNA 6000 Pico marker, Agilent Technologies). Em seguida, o ladder foi colocado em um poço específico e por último no aparelho de leitura Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies). Após a leitura, um software (2100 Expert Software, Agilent Technologies) do aparelho quantifica e analisa a integridade do RNA. Na Figura 9A podemos observar o gráfico obtido do calibrador, o Reagent II Ladder do kit (Agilent Technologies), que apresenta sete picos das bandas de RNA controle, que foi utilizado como calibrador na quantificação do RNA das amostras. Na Figura 9B observamos a quantificação de uma das amostras que apresenta dois picos referentes as bandas 18s e 28s do RNA. O pico inicial presente se refere a uma possível fragmentação do DNA. A concentração obtida dessa amostra exemplo foi de 27 pg/ μ l.

Figura 9 - Gráficos do Bioanalyzer. A: Gráfico representativo da validação do Reagent II Ladder utilizado como calibrador. B: Imagem representativa do resultado da quantificação de uma das amostras pelo método de Bioanalyzer. As setas indicam os picos referentes à banda 18s e 28s do RNA.

3.10 qPCR

O cDNA foi sintetizado através do kit comercial M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, UK) e 54 ng/ul de RNA total extraído do tecido microdissecado, juntamente com 1 μl de Oligo dT, 1 μl de dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), completados com água RNA-free para um volume final de 12 μl. As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 min, seguida da adição de 4 μl de 5 x First-Strand Buffer, 2 μl de 0.1 M DTT e 1 μl de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor. Em seguida as amostras foram incubadas a 37 °C por 2 min seguida da

adição de 1 µl da enzima de transcriptase reversa M-MLV RT. Após homogeneização suave as amostras foram incubadas a 37 °C por 50 min seguida da incubação a 70 °C por 15 min, para inativar a reação. Após essa reação o cDNA sintetizado está pronto para a reação de qPCR. Para fazer o mix da reação foi utilizado 1 µl (2,7 ng) de cDNA, juntamente com 6,25 µl de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems®, Life Technologies, UK), e 5,25 µl água RNA-free para completar um volume final de 12,5 µl, onde foi aplicado em cada poço da placa de PCR. Em seguida vedamos e centrifugamos a 1000 rpm por 1 min e colocamos no aparelho de PCR ABI 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®) para realizar a leitura da placa.

3.11 Análise estatística

A análise estatística dos resultados do peso corpóreo e do ACTH plasmático foi realizada por teste de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls. Para a análise dos resultados da placa de PCR Array foram utilizados cinco animais de cada grupo experimental. Foram consideradas relevantes as diferenças de expressões dos genes que tiverem um $p < 0,05$ calculado pelo teste -t Student, em relação ao controle. Além disso, foi realizado o teste $2^{\Delta\Delta ct}$ para analisar a expressão relativa entre os genes. Para análise dos resultados do PCRq foram utilizados pelos menos três animais de cada grupo experimental.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos genótipos dos camundongos UBC-Cre/ERT² e *Pomc*^{Flox/Flox} e das linhagens obtidas Cre *Pomc*^{Flox/Flox}, Cre *Pomc*^{Flox/+} e *Pomc*^{Flox/Flox}

Na Figura 10A podemos observar o perfil genotípico da linhagem hemizigota UBC-Cre/ERT² (Cre/ERT²) representada pelas bandas de 327 pb (pares de bases) e de 100 pb, que corresponde a amplificação da enzima Cre, comparada com o animal selvagem (WT), linhagem C57BL6. Na Figura 10B as bandas das linhas 1 e 4 correspondem aos animais selvagens *Pomc*^{Flox/Flox} com 657 pb, nas linhas 2 e 5 os animais heterozigotos Cre *Pomc*^{Flox/+} representados pelas bandas de 657 e 770 pb, e os animais homozigotos Cre *Pomc*^{Flox/Flox} com a banda de 770 pb nas linhas 3 e 6.

Figura 10 - Fotos representativas da caracterização genotípica das linhagens. A) UBC-Cre/ERT² e animal C57BL6 B) das linhagens após cruzamento da linhagem UBC-Cre/ERT² e *Pomc*^{Flox/Flox}: 1 e 4: animais selvagens (*Pomc*^{+/+}); 2 e 5 animais heterozigotos (*Pomc*^{Flox/+}) e 3 e 6 animais homozigotos (*Pomc*^{Flox/Flox}). PM: peso molecular. WT: animal selvagem (C57BL6). Cre: linhagem Cre/ERT². H₂O: controle negativo.

4.2 Caracterização dos animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} que tiveram ou não reposição de corticosterona

Como descrito em materiais e métodos os animais tratados com Tamoxifeno para silenciamento do gene *Pomc* foram tratados ou não com corticosterona na água, uma vez que não sabíamos se esse animal sobreviveria sem o eixo HPA

4.2.1 Resultados da caracterização dos animais tratados com corticosterona

4.2.1.1 A concentração plasmática do ACTH circulante.

Conforme podemos observar na Figura 11 há uma diminuição significativa ($p=0.0263$) de 80.11+ 9.9 % do ACTH plasmático em animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com Tamoxifeno em comparação com o animal controle *Pomc*^{Flox/Flox}.

Figura 11 - Concentração plasmática do ACTH nos animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com Tamoxifeno (25 mg/mL) por 5 dias e corticosterona (25 µg/mL). Análise pelo método ANOVA, n=5.

4.2.1.2 Análise do peso corpóreo e da ingestão de alimento

A análise do peso corpóreo dos animais após tratamento com Tamoxifeno (Figura 12A) mostrou um aumento significativo de $4.87\% \pm 7.50$ vezes no peso do animal *Cre Pomc^{Flox/Flox}* (13.36 ± 8.2) quando comparado com o animal controle *Pomc^{Flox/Flox}* (2.74 ± 0.8). No entanto, o animal heterozigoto *Cre Pomc^{Flox/+}* ($4.37 \pm 1,2$) não apresentou um aumento significante de seu peso. Quando a ingestão de alimentos foi analisada observamos que os animais *Cre Pomc^{Flox/Flox}* apresentaram um aumento significativo de $17.59\% \pm 0.6$ do consumo de alimento (Figura 12B).

Figura 12 - Peso e ingestão de alimentos em animais *Cre Pomc^{Flox Flox}* com reposição de corticosterona. A) Análise do peso corpóreo dos animais *Cre Pomc^{Flox/Flox}* tratados com Tamoxifeno por 5 dias e com corticosterona. B) Análise do consumo alimentar antes e depois do tratamento com Tamoxifeno. * $p < 0.05$; $n = 7-10$.

4.2.1.3 Análise microscópica das glândulas adrenais

A Figura 13 apresenta secções do córtex adrenal de cada animal estudado ampliadas 10, 20 e 40 vezes. Na Figura 13A podemos observar secções das glândulas do animal heterozigoto *Cre Pomc^{Flox/+}*, e na Figura 13B do animal *Pomc^{Flox/Flox}*, que não apresentam alterações do córtex adrenal. No entanto, o animal *Cre Pomc^{Flox/Flox}* (Figura 13C) apresentou uma diminuição atenuada do córtex adrenal e um aumento da cápsula adrenal.

Figura 13 - Análise microscópica da glândula adrenal. A) Animais heterozigotos *Cre Pomc^{Flox/+}* tratados com tamoxifeno. B) Animais sem a enzima Cre, os animais *Pomc^{Flox/Flox}* tratados com Tamoxifeno. C) Animais *Cre Pomc^{Flox/Flox}* tratados com Tamoxifeno e corticosterona. Imagens 1, 2 e 3 ampliadas 10 x, 20 x e 40 x, respectivamente.

4.2.2 Caracterização dos animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} sem reposição de corticosterona

4.2.2.1 A concentração plasmática do ACTH circulante.

Na Figura 14 observamos uma diminuição significativa de 51.7 ± 6.4 ($p < 0.0001$) do ACTH plasmático em animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com Tamoxifeno em comparação com o animal controle *Pomc*^{Flox/Flox}. No animal heterozigoto não foi observado diferença (resultado não apresentado).

Figura 14 - Concentração plasmática do ACTH nos animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com Tamoxifeno (25 mg/mL) por 5 dias. Análise pelo teste t de Student, n= 9-10.

4.2.2.2 Análise do peso corpóreo e da ingestão de alimento

A análise do peso corpóreo dos animais após tratamento com Tamoxifeno (Figura 15) mostrou um aumento significativo de 6.22 ± 1.4 gramas no animal Cre *Pomc*^{Flox/Flox}, enquanto no animal controle *Pomc*^{Flox/Flox} o aumento foi de 2.13 ± 0.5 gramas. Portanto, o animal Cre *Pomc*^{Flox/Flox} teve um aumento significativo ($p < 0.0157$) de 4.08 ± 1.5 gramas em relação ao controle. Quando a ingestão de

alimentos foi analisada observamos que os animais *Cre Pomc^{Flox/Flox}* apresentaram um aumento significativo de 0.6 ± 0.4 do consumo de alimento (Figura 16).

Figura 15 - Análise do peso corpóreo dos animais tratados com Tamoxifeno (25 mg/mL) por 5 dias. n= 9.

Figura 16 - Análise comparativa do consumo alimentar dos animais antes e após tratamento com Tamoxifeno. *p <0.05; n= 7-10.

4.2.2.3 Análise microscópica das glândulas adrenais

A Figura 17 apresenta secções do córtex adrenal de cada animal estudado ampliadas 10, 20 e 40 vezes. Na Figura 17A podemos observar secções das glândulas do animal *Pomc*^{Flox/Flox} que não apresentaram alterações do córtex adrenal. No entanto, o animal *Cre Pomc*^{Flox/Flox} sem reposição de corticosterona (Figura 17B) apresentou uma diminuição discreta do córtex adrenal.

Figura 17 - Análise microscópica da glândula adrenal. A) Animais *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com tamoxifeno. B) Animais *Cre Pomc*^{Flox/Flox} tratados com Tamoxifeno. Imagens 1, 2 e 3 ampliadas 10 x, 20 x e 40 x, respectivamente.

4.3 Análise da expressão gênica dos animais *Cre Pomc*^{Flox/Flox} por PCR array

Uma vez que os animais sem a influência da corticosterona apresentaram as características semelhantes de silenciamento do gene *Pomc*, a análise da expressão dos genes diferencialmente expressos, após tratamento com ACTH, foi realizada nos animais *Cre Pomc*^{Flox/Flox} após tratamento com o Tamoxifeno. As amostras de cDNA para essa análise foram obtidas da região externa da glândula após a utilização da técnica de rolamento da glândula adrenal de animais tratados com ACTH ou tratados com solução salina. As amostras de cDNA obtidas dos grupos de animais *Cre Pomc*^{Flox/Flox} tratados com ACTH por 1 ou 2 hs foram comparadas com

os grupos de animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com solução salina pelo mesmo período, e considerados como os controles.

4.3.1 Análise da expressão gênica dos animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados por 1 h com ACTH

A análise da expressão dos genes das amostras obtidas de animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com por 1 h com ACTH foi comparada com animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados por 1 h com salina (Figura 18) e Tabela 1. Na Figura 18 observamos que vários genes estão mais expressos (amarelo) ou inibidos (azul), enquanto a maioria dos genes não apresentou alteração (preto). Os genes que apresentaram a expressão aumentada de maneira significativa, respectivamente, $p = 0.001$ e $p = 0.016$, após 1 h de tratamento com ACTH foram os genes *Igf1* (Insulin-like growth factor 1) e *Wnt1* (wingless-type MMTV integration site family, member 1).

Figura 18 - Expressão gênica em animais ACTH 1 h comparados com Salina 1 h. Representação gráfica dos genes com a expressão aumentada (amarelo) e diminuída em (azul) das amostras dos animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados (ACTH1h) em relação ao controle (Salina1h). Em preto os genes que não sofreram alteração. $n=5$

Tabela 1 - Relação dos genes com a expressão aumentada após tratamento com ACTH por 1 h

Gene		Aumento (x) p-Value	
<i>Igf1</i>	Insulin-like growth factor 1	2.73	0.001
<i>Wnt1</i>	Wingless-related MMTV integration site 1	2.65	0.016

Na Tabela 2 estão relacionados os 27 genes que tiveram sua expressão diminuída de maneira significativa pelo tratamento com 1 h de ACTH. O gene *Dtx1* foi o que apresentou a maior inibição (-9.3 vezes; $p=0.002$).

Tabela 2 - Relação dos genes com expressão diminuída após tratamento com ACTH por 1 h

Gene		Diminuição(x)	p-Value
<i>Dtx1</i>	Deltex 1 homolog (Drosophila)	-9.28	0.002
<i>Fgf3</i>	Fibroblast growth factor 3	-4.72	<0.0001
<i>Ccne1</i>	Cyclin E1	-4.72	0.006
<i>Btrc</i>	Beta-transducin repeat containing protein	-4.66	0.0003
<i>Bmp2</i>	Bone morphogenetic protein 2	-4.62	0.004
<i>Col9a1</i>	Collagen, type IX, alpha 1	-4.50	0.006
<i>Acan</i>	Aggrecan	-3.75	0.009
<i>Ncam1</i>	Neural cell adhesion molecule 1	-3.73	0.008
<i>Dvl1</i>	Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	-3.70	0.007
<i>Cdh2</i>	Cadherin 2	-3.67	<0.0001
<i>Notch1</i>	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	-3.64	0.005
<i>Numb</i>	Numb gene homolog (Drosophila)	-2.96	0.0007
<i>Kat8</i>	MYST histone acetyltransferase 1	-2.96	0.0002
<i>Dxt2</i>	Deltex 2 homolog (Drosophila)	-2.93	0.0003

Sox2	SRY-box containing gene 2	-2.80	0.03
Gdf3	Growth differentiation factor 3	-2.80	0.03
Bmp3	Bone morphogenetic protein 3	-2.73	0.03
Dll1	Delta-like 1 (Drosophila)	-2.47	0.01
Axin1	Axin1	-2.35	<0.0001
Cd19	CD19 antigen	-2.35	0.001
Aldh2	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	-2.35	0.001
Gja1	Gap junction protein, alpha 1	-2.34	0.02
Frat1	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas	-2.34	0.004
Bmp1	Bone morphogenetic protein 1	-2.33	0.002
Tubb3	Tubulin, beta 3	-2.31	0.003
Adar	Adenosine deaminase, RNA-specific	-2.30	0.01

4.3.2 Análise da expressão gênica dos animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados por 2 hs com ACTH

Na Figura 19 observamos a análise da expressão dos genes das amostras obtidas de animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com ACTH 2 hs comparados com animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com salina. Foram estimulados de maneira significativa, respectivamente $p < 0.001$ e $p = 0.008$, os genes *Sox2* (SRY-box containing gene 2) e *Cdh2* (Cadherin 2) conforme Tabela 3.

Figura 19 - Expressão gênica em animais ACTH 2 hs comparados com Salina 2 hs. Representação gráfica dos genes com expressão aumentada (amarelo) e diminuída em (azul) das amostras dos animais *Cre Pomc^{Flox/Flox}* tratados (ACTH2h) em relação ao controle (Salina2h). Em preto os genes que não sofreram alteração. n=5

Tabela 3 - Relação dos genes com expressão aumentada após tratamento com ACTH por 2 hs

Gene		Regulação	p-Value
Sox2	SRY-box containing gene 2	4.62	<0.0001
Cdh2	Cadherin 2	2.01	0.009

Na Tabela 4 estão relacionados os 10 genes que tiveram sua expressão diminuída de maneira significativa pelo tratamento com 2 hs de ACTH. O gene *Krt15* foi o que apresentou a maior inibição (-5.91 vezes; p=0.001).

Tabela 4 - Relação dos genes com expressão diminuída após tratamento com ACTH por 2 hs.

Genes		Diminuição(x)	p-Value
Krt15	Keratin 15	-5.91	0.001
Abcg2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	-4.35	0.001
Col9a1	Collagen, type IX, alpha 1	-3.95	0.006
Ascl2	Achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila)	-2.55	0.021
Msx1	Homeobox, msh-like 1	-2.38	0.01
Cd8a	CD8 antigen, alpha chain	-2.34	0.009
Tubb3	Tubulin, beta 3	-2.18	0.03
Frat1	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas	-2.18	0.007
Cd3d	CD3 antigen, delta polypeptide	-2.16	0.005
Dll3	Delta-like 3 (Drosophila)	-2.15	<0.0001

4.3.3 Comparação da análise da expressão gênica dos animais Cre Pomc Flox/Flox tratados por 1 h e 2 hs com ACTH

Com a intenção de detectarmos os genes que sofreram alterações de maneira tempo-dependente, comparamos os genes que sofreram alterações na sua expressão após 2 hs de tratamento com ACTH, com os genes expressos com 1 h de

tratamento com ACTH (Figura 20). Essa comparação mostrou que 26 genes foram positivamente e significativamente modulados e estão apresentados na Tabela 5. Os genes que foram inibidos foram os genes *Fgf4*, *Col2a1*, *Krt15* e *Igf1* (Tabela 6).

Figura 20 - Expressão gênica em animais ACTH 1 h comparados com ACTH 2 hs. Representação gráfica dos genes com expressão aumentada (amarelo) e diminuída em (azul) das amostras dos animais *Cre Pomc^{Flox/Flox}* tratados (ACTH1h), em relação aos animais *Cre Pomc^{Flox/Flox}* tratados (ACTH2h). Em preto os genes que não sofreram alteração. n=5.

Tabela 5 - Relação dos genes com expressão aumentada entre animais ACTH 1h e ACTH 2 hs.

Gene		Aumento(x)	p-Value
<i>Acan</i>	Aggrecan	19.71	0.01
<i>Dtx1</i>	Deltex 1 homolog (Drosophila)	14,67	<0.0001

<i>Cdh2</i>	Cadherin 2	5.77	0.0002
<i>Dvl1</i>	Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	5.71	0.0002
<i>Ccne1</i>	Cyclin E1	5.13	0.01
<i>Notch1</i>	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	4.86	0.004
<i>Btrc</i>	Beta-transducin repeat containing protein	4.85	0.003
<i>Dtx2</i>	Deltex 2 homolog (Drosophila)	4.83	<0.0001
<i>Bmp2</i>	Bone morphogenetic protein 2	4.36	0.004
<i>Adar</i>	Adenosine deaminase, RNA-specific	4.06	0.02
<i>Fgf3</i>	Fibroblast growth factor 3	3.94	0.03
<i>Tert</i>	Telomerase reverse transcriptase	3.61	0.0004
<i>Frat1</i>	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas	3.24	0.001
<i>Bmp1</i>	Bone morphogenetic protein 1	3.21	0.0007
<i>Dll1</i>	Delta-like 1 (Drosophila)	3.13	0.008
<i>Numb</i>	Numb gene homolog (Drosophila)	3.07	0.007
<i>Tubb3</i>	Tubulin, beta 3	3.02	0.01
<i>Kat8</i>	MYST histone acetyltransferase 1	2.89	0.001
<i>Ncam1</i>	Neural cell adhesion molecule 1	2.86	0.002

<i>Axin1</i>	Axin 1	2.73	0.004
<i>Aldh2</i>	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	2.72	0.006
<i>Sigmar1</i>	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	2.57	0.0006
<i>Ep300</i>	E1A binding protein p300	2.55	0.0006
<i>Isl1</i>	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain	2.30	0.007
<i>Notch2</i>	Notch gene homolog 2 (Drosophila)	2.16	0.01
<i>Kat2a</i>	K(lysine) acetyltransferase 2A	2.05	0.02

Tabela 6 - Relação dos genes com expressão diminuída entre animais ACTH 1h e ACTH 2 hs.

Gene		Diminuição (p-Value)	
<i>Fgf4</i>	Fibroblast growth factor 4	-39.79	0.04
<i>Col2a1</i>	Collagen, type II, alpha 1	-10.47	0.05
<i>Krt15</i>	Keratin 15	-2.76	0.004
<i>Igf1</i>	Insulin-like growth factor 1	-2.09	0.02

A análise da expressão dos genes que sofreram uma indução de expressão entre 1 h e 2 hs de tratamento com ACTH apontam para dois genes, os genes *Acan* (Aggrecan), e o gene *Dtx1* (Deltex 1), que estavam reprimidos com 1 h de ACTH, respectivamente -3.8 e -9.3 vezes, e que apresentaram um aumento de, respectivamente 19.7 e 14.7 vezes.

4.3.4 Validação da expressão dos genes modulados após tratamento com ACTH.

A validação dos resultados obtidos da reação nas placas de PCR array, foram validados por RT-PCR quantitativo. O cDNA utilizado foi obtido da região mais externa do córtex adrenal obtida através da técnica de rolamento. Os genes que apresentaram a expressão aumentada de maneira significativa, após 1 h de tratamento com ACTH foram os genes *Igf1* (Insulin-like growth factor 1) e *Wnt1* (wingless-type MMTV integration site family, member 1). Nas Figuras 21A e 21B corroboramos o aumento da expressão dos genes *Igf1* e *Wnt1*, que apresentaram, respectivamente um aumento de 2.2 ± 0.7 e 4.3 ± 0.5 após os animais terem sido tratados com 1 h com ACTH.

Figura 21 - Expressão relativa dos genes *Igf1* e *Wnt1* em animais tratados por 1 h com ACTH (ACTH1h) comparados com animais tratados com solução salina (Salina1h). n=3

Por sua vez, animais tratados com 2 hs de ACTH estimularam dois outros genes, os genes *Sox2* (SRY-box containing gene 2) e *Cdh2* (Cadherin 2) conforme a Tabela 3. Na Figura 22A e 22B o aumento é validado, de maneira que a expressão do *Sox2* e do gene *Cdh2* foram de, respectivamente, 1.9 ± 0.7 e 1.8 ± 0.7 após tratamento com 2 hs de ACTH.

Figura 22 - Expressão relativa dos genes *Sox2* e *Cdh2* em animais tratados por 2 hs com (ACTH2h) comparados com animais tratados com solução salina (Salina2h). n=3.

Quando comparamos os genes que apresentaram aumento na sua expressão após 2 hs com 1 h de tratamento com ACTH observamos 26 genes positivamente modulados (Tabela 5), dentre eles, os genes *Acan* (Aggrecan) e o gene *Dtx1* (Deltex 1 homolog (Drosophila)), que apresentaram os aumentos mais expressivos. A validação por PCRq mostrou aumentos significativos de, respectivamente, 9.4 ± 1.3 e 4.8 ± 0.9 , para os genes *Acan* e *Dtx1* (Figura 23A e 23B), o que corrobora os resultados obtidos por PCR array.

Figura 23 - Expressão relativa dos genes *Dtx1* e *Acan* em animais tratados por 2 hs com (ACTH2h) comparados com animais tratados por 1 h com ACTH (ACTH1h). n=3.

4.4 - Análise da expressão dos genes modulados por 1 h e 2 hs de ACTH de amostras obtidas por microdissecção.

Com o intuito de aumentar a especificidade das amostras obtidas das regiões consideradas regiões das células menos diferenciadas do córtex adrenal, capsula e subcapsula, e com isso eliminar a possível interferência de células adjacentes à essa região, como as células da zona da Glomerulosa, foram obtidos cDNAs por microdissecção da região da cápsula e subcapsula, que foram analisados por qPCR. Os genes analisados foram aqueles que apresentaram uma expressão aumentada após tratamentos com 1 h e 2 hs de ACTH e da comparação entre esses tratamentos.

Na Figura 24 observamos um aumento significativo da expressão dos genes *Igf1* e *Wnt1* de respectivamente, 0.23 ± 0.03 e 20.04 ± 3.3 em relação ao controle, que contrasta com os resultados obtidos com cDNA obtido após a técnica de rolamento que foram respectivamente, 2.2 ± 0.7 e 4.3 ± 0.5 após o mesmo tratamento com 1 h de ACTH.

Figura 24 - Expressão relativa dos genes *Igf1* e *Wnt1* de animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tratados com 1 hora de ACTH (ACTH1h) e animais tratados com salina por 1 hora (Salina1h), obtido de material microdissecado. n=3.

A análise da expressão dos genes *Sox2* e *Cdh2* após 2 hs de tratamento com ACTH em cDNA obtido das amostras microdissecadas contrasta com os resultados obtidos anteriormente (Tabela 3). No cDNA obtido do material dissecado

observamos uma inibição de -0.94 ± 0.002 e -0.99 ± 0.002 , respectivamente, dos genes *Sox2* e *Cdh2* (Figura 25).

Figura 25 - Expressão relativa dos genes *Sox2* e *Cdh1* de animais *Cre Pomc^{Flox/Flox}* tratados com 2 hs de ACTH (ACTH2h) e animais tratados com salina por 2 hs (Salina2h), obtido de material microdissecado. n=3.

A comparação da expressão dos genes *Dtx1* e *Acan* em animais tratados com 1 h de ACTH e 2 hs de ACTH mostrou que, diferentemente do observado com o cDNA obtido do material do rolamento (respectivamente, 4.8 ± 0.9 e 9.4 ± 1.3), somente o gene *Dtx1* apresentou uma expressão aumentada de 14.0 ± 0.6 . O gene *Acan* após 2 hs de tratamento com ACTH não apresentou expressão após tratamento com 1 h de ACTH (Figura 26).

Figura 26 - Expressão relativa dos genes *Dtx1* e *Acan* de animais *Cre Pomc^{Flox/Flox}* tratados com 1 h de ACTH (ACTH1h) e animais tratados com 2 hs de ACTH (ACTH2h), obtido de material microdissecado. n=3.

5 DISCUSSÃO

Esse estudo utilizou um modelo de animal knock-out induzível por Tamoxifeno devidamente caracterizado através da genotipagem padronizada com primers específicos, análise microscópica, medidas do peso corpóreo e ingestão de alimentos. Nesse modelo o gene *Pomc* foi parcialmente reprimido na fase adulta do animal em que a glândula adrenal está desenvolvida e funcional, diferente do modelo animal *Pomc*^{-/-} utilizado em outros estudos (KRUDE et al., 1998; YASWEN et al., 1999). No modelo animal *Pomc*^{-/-}, a glândula não está totalmente desenvolvida, o que acarretou obesidade, alteração na pigmentação do animal, além de causar insuficiência adrenal severa e morte antes da fase adulta, o que limitou a utilização do modelo. Assim o modelo de animal Cre *Pomc*^{Flox/Flox} tem como vantagem a indução do silenciamento da *Pomc* em qualquer etapa da vida do animal, seja em neonato ou na fase adulta.

Foram utilizadas duas abordagens para manutenção dos animais após silenciamento do gene *Pomc* com o Tamoxifeno, com e sem reposição de corticosterona. A reposição da corticosterona tinha como função testar a capacidade de sobrevivência dos animais sem o eixo HPA. Nesse modelo observamos que os animais apresentaram uma diminuição de aproximadamente 80% do ACTH circulante, um aumento do peso corpóreo e da ingestão de alimentos além de uma atrofia severa do córtex adrenal. Esses dados corroboram dados da literatura, onde mostram que a deficiência dos peptídeos derivados da POMC podem causar alterações na morfologia e funcionalidade da glândula adrenal (YASMEN et al., 1999). Porém, as alterações detectadas poderiam ser também em função do feedback negativo induzido pela corticosterona e não somente pelo silenciamento da gene *Pomc* pelo Tamoxifeno. Portanto, animais sem tratamento com corticosterona foi testado quanto à sobrevivência e observamos que conseguiam sobreviver por longos períodos. Assim, foram realizadas as análises para caracterização dos animais Cre *Pomc*^{Flox/Flox} sem reposição de corticosterona e os resultados foram uma diminuição de aproximadamente 51% do ACTH circulante, aumento do peso e da ingestão de alimentos atenuados em relação ao modelo anterior, que resultou em uma atrofia não significativa do córtex adrenal.

Sabe-se que o ACTH tem ação esteroideogênica no córtex adrenal e que juntamente com os peptídeos N-POMC atuam na manutenção da glândula

(PEDERSEN; BROWNIE, 1980; SCHIMMER, 1980). Animais que foram tratados com Dexametosona, esteroide sintético que inibe o eixo HPA, e que posteriormente foram tratados com ACTH, apresentaram células na fase “S” do ciclo celular (TORRES et al., 2010). Outros estudos com animais hipofisectomizados e tratados com ACTH, mostraram hiperplasia na zona Glomerulosa e hipertrofia da zona Reticular e Fasciculada do córtex adrenal, além de bloquear a morte celular por apoptose (CARSIA et al., 1996; TORRES et al., 2010). Existem diversos estudos que mostram células indiferenciadas na região capsular e subcapsular da glândula adrenal (HUANG et al., 2010; KIM et al., 2009; SIMON; HAMMER., 2012; WOOD et al., 2013; WOOD; HAMMER., 2011), de maneira que o ACTH poderia estimular essas células a se diferenciarem (HAMMER., 2006; PIGNATELLI et al., 2002; WINNAY), sendo assim essencial para a manutenção, desenvolvimento e regeneração dessa glândula.

A análise da expressão gênica das glândulas dos animais tratados com ACTH por 1 h detectou genes envolvidos com a diferenciação e manutenção de tecidos. Dois genes, o gene *Wnt1* e *Igf1*, tiveram a expressão aumentada, e ambos fazem parte de uma sinalização conservada, e estão relacionados em diversos processos em diferentes tecidos, dentre eles a glândula adrenal (BANDIERA et al., 2013; LUO; IKEDA; PARKER, 1994; MOORE et al., 1999; VAL et al., 2007; VIDAL; SCHEDL, 2000). Sinalização *Wnt* é uma via que regula vários processos celulares como, proliferação, diferenciação e apoptose, todos essenciais para o desenvolvimento embrionário e para a manutenção de tecido adulto. Essa via possui diferentes mecanismos de sinalização, sendo a via de *Wnt/β-catenina* de relevante importância na suprarrenal (BERTHON et al., 2012; BERTHON et al., 2014; CLEVERS; NUSSE, 2012; WALCZAK; HAMMER, 2014). A ativação da via de sinalização *Wnt/β-catenina* libera a β -catenina de seu complexo citoplasmático e se acumula no citoplasma e pode ir para o núcleo e funcionar como um cofator de transcrição nuclear e transcrever vários genes (DRELON et al., 2015; LIU et al., 2002). Estudos com animais geneticamente modificados mostraram que a ativação da via *Wnt* ocorre nos primórdios da glândula adrenal, e em células da zona capsular das glândulas de fetos e de animais adultos. No córtex adrenal esta via está relacionada com a manutenção das características não diferenciadas das células progenitoras do córtex adrenal (SIMON; HAMMER., 2012). Além disso, o aumento de sua expressão

está relacionado com a tumorigênese adrenal (DRELON et al., 2015; KIM et al., 2008).

Outro gene importante para o desenvolvimento de diversos tecidos é o gene *Igf1* (fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1), cuja função é de fator de crescimento e da progressão celular (JONES; CLEMMONS, 1995; LEROITY, 1996; STEWART; ROTWEIN, 1996). A alteração da sua expressão e de sua via de regulação está relacionada com tumores, entre eles o carcinoma adrenocortical. Nesses tumores, os genes da família dos Igfs mais frequentemente desregulados são os genes IGF1R (insulin-like growthfactor receptor 1) e IGF2 (Insulin-like growth factor 2) (HAMMER, 2009; RIBEIRO; LATRONICO, 2012; RYAN; GOSS, 2008). Na adrenal, esses genes tem um papel importante no desenvolvimento da glândula e estimula a produção de glicocorticoides em células do córtex adrenal. Além disso, a expressão de IGF1R é essencial para a determinação do sexo na embriogênese e durante a adrenarca. Nesse caso o IGF1R é relacionado como um fator que regula a proliferação e migração de células progenitoras que estariam localizadas na parte mais externa da adrenal (BELGOROSKY, et al., 2009; JACKSON, et al., 1991; PITETTI et al 2013).

O gene N-caderina Tipo 2 ou *Cdh2*, que foi estimulado juntamente com o gene *Sox2* após 2 hs de tratamento com ACTH, é um gene relacionado com o desenvolvimento, adesão célula-célula e destino celular na diferenciação. Por estar envolvida na adesão celular a proteína transcrita por esse gene possibilita interações necessárias para a diferenciação e proliferação, além de ser importante para a assimetria celular. Na fase embrionária esta relacionada com o desenvolvimento das camadas ectodérmica e mesodérmica (ALIMPERTI; ANDREADIS, 2015; SIMONNEAU et al., 1995). Animais “knock-out” não sobreviveram após 10 dias do nascimento por apresentarem má formação cardíaca e neural (RADICE et al., 1997), e em carcinomas da adrenal esse gene está regulado negativamente (VELAZQUEZ-FERNANDEZ et al., 2005).

Por outro lado, o gene *Sox2* é um fator de transcrição envolvido com a renovação celular, destino celular e manutenção de células embrionárias e neurais. Esta relacionada como um gene chave para a indução de IPSc (induced pluripotent stem cells), sendo conhecido como um dos “fatores de Yamanaka”, que são fatores de transcrição embrionários que induz a pluripotência em células mais diferenciadas,

como fibroblastos (YAMANAKA; TAKAHASHI, 2006). Na hipótese foi relacionado como um marcador de células progenitoras, responsável pela remodelação do tecido hipofisário (VANKELECOM; GREMEAUX, 2010). Outros integrantes da família desse gene, como *Sox8* e *Sox10* são expressos na crista neural, que dará origem à medula da glândula adrenal, de maneira que animais com deleção do gene *Sox10* não desenvolveram medula adrenal (REIPRICH et al., 2008). Apesar de, até aonde saiba, não existirem evidências que envolvam o gene *Sox2* nos processos de manutenção ou crescimento do córtex adrenal, esse gene tem como característica a manutenção da pluripotência das células, portanto sua importância no córtex adrenal merece ser estudado futuramente.

O gene *Acan* ou cartilage-specific proteoglycan core protein (CSPCP) tem como produto uma proteína denominada agrecano, que é o principal proteoglicano da matriz extracelular do tecido cartilaginoso. Atua como, importante fator para a estrutura e função das cartilagens e articulações, pois tem papel na lubrificação natural necessária para essas regiões (MWALE et al., 2006; SCHWARTZ et al., 2014; WIMPENNY; ASHAMMAKHI; YANG, 2002). O aumento da expressão do gene *Acan* após 2 hs de tratamento com ACTH sugere uma remodelação da matriz extracelular induzida pelo ACTH, no entanto, até o momento desconhecemos seu papel no córtex adrenal.

Outro gene que teve uma expressão aumentada nas amostras dos animais tratados com ACTH 2 hs foi o gene *Dtx1* (Deltex 1, E3 Ubiquitin Ligase). Seu produto funciona como uma proteína ubiquitina ligase que atua no domínio intracelular do receptor NOTCH regulando positivamente a sinalização da via *Notch* (HUGHES et al., 2010). A via de sinalização *Notch* é uma via de sinalização altamente conservada e desempenha um papel fundamental na proliferação e diferenciação celular (ARTAVANIS-TSAKONAS, 1999; KOCH; RADTKE, 2007). Foram caracterizados em mamíferos quatro receptores (*Notch* 1-4) e cinco ligantes (*Jagged* 1 e 2, homólogos de *Serrate*; *Delta* 1, 3 e 4, homólogos de *Delta*). Existem evidências que *Notch2* é expresso apenas na zona capsular da adrenal, zona essa serviria como um nicho de células progenitoras (WOOD; HAMMER, 2011). Em outros estudos foi observado que o ligante *Delta-1* Homólogo (*Dlk1*) é expresso na zona subcapsular e que interage diretamente com *Notch1*, estimulando a expressão de *Gli1* nas células da zona capsular da adrenal (BALADRON et al., 2005; GUASTI et al., 2013). Essa via também está relacionada com tumores adrenocorticais, o

que sugere uma importância na proliferação e desenvolvimento dessa glândula (RONCHI et al., 2012).

As análises que utilizaram placa de PCR Array foram validadas por PCRq com amostras de cDNA e primers específicos para cada gene alterado. Além disso, realizamos uma análise da expressão gênica com amostras de cDNA originadas de tecido microdissecado, uma vez que essa técnica permite capturar de forma específica, células das zonas mais externas do córtex adrenal, cápsula e subcápsula, sem a interferência da zona adjacente, a zona Glomerulosa, como pode acontecer com a obtenção das amostras pela técnica de rolamento.

A validação por qPCR das amostras do material microdissecado mostrou que somente os genes *Igf1* e *Wnt1* nos animais tratados por 1 h com ACTH e o gene *Dtx1* nos animais tratados por 2 hs ACTH em relação aos tratados por 1 h com ACTH foram modulados. Esses resultados sugerem que esses são os genes representativos da ação do ACTH na região capsular e subcapsular da glândula adrenal.

Esses genes que tiveram a expressão estimulada pelo ACTH nas células das amostras microdissecadas da região capsular e subcapsular da adrenal, são genes envolvidos com vias relacionadas com o desenvolvimento e manutenção da adrenal. Segundo a Figura 27, pode existir uma provável interação entre as vias dos genes *Wnt1* e *Igf1* através do gene *CTNNB1* (Beta-catenina), relacionado com adesão, citoesqueleto e ativação de outros genes. Além disso, mutações nesse gene ou na via Wnt podem estar relacionadas com carcinomas adrenocorticais (BONNET et al., 2011; GAUJOUX et al., 2011). O gene *Dtx1* apresenta interação física com seu ligante Notch1, que por sua vez pode interagir com CTNNB1.

Figura 27 - Gráfico representativo das interações entre os genes que tiveram sua expressão aumentada significativa.

Como descrito anteriormente (WALCZAK; HAMMER, 2015) as células da região capsular expressam *Wnt*, e que esse gene está envolvido na cascata de diferenciação das prováveis células progenitoras da região capsular e subcapsular. Essa via teria um papel na diferenciação das células do córtex adrenal e no “turnover” celular (BANDIERA et al., 2013; DRELON et al., 2015; WALCZAK; HAMMER, 2015). Além disso, o gene *Igf1* estaria expresso na capsula e o gene *Notch1*, ligante da proteína do gene *Dtx1*, expresso na região subcapsular, poderiam atuar na proliferação dessas células (WALCZAK; HAMMER, 2015; MENDONÇA et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

O modelo biológico proposto de silenciamento induzível do gene *Pomc* para o estudo dos mecanismos de ação do ACTH nas células progenitoras foi validado através da análise da concentração do ACTH plasmático, do aumento do peso corpóreo e do consumo alimentar, e da atrofia adrenocortical. De forma que, foi estabelecido um protocolo adequado para o estudo proposto.

As análises de expressão gênica após 1 h e 2 hs de tratamento com ACTH nas amostras obtidas através da técnica de rolamento mostraram um aumento de genes envolvidos com as vias de sinalização *Wnt*, *Igf1* e *Notch*. Além disso, podem estar envolvidos genes relacionados com proliferação e diferenciação como os genes *Sox2*, *Cdh2* e *Acan*. Através das amostras de tecido microdissecado e análise por qPCR foram confirmados os genes *Wnt1*, *Igf1* e *Dtx1* estimulados pelo ACTH. Esses resultados confirmam e ampliam a importância de genes chaves modulados sob estímulo do ACTH nas células progenitoras da região mais externa do córtex adrenal.

REFERÊNCIAS*

ALIMPERTI, S.; ANDREADIS, S. T. CDH2 and CDH11 act as regulators of stem cell fate decisions. **Stem Cell Res.**, v. 14, p. 270-282, 2015.

ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; RAND, M.D.; LAKE, R.J. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. **Science**. v. 284, p. 770-776, 1999.

BALADRON, V. et al. Dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. **Exp. Cell Res.**, v. 303, p. 343–359, 2005.

BANDIERA, R. et al. WT1 maintains Adrenal-Gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within adrenal gland. **Dev. Cell.**, v. 14, p. 5-18, 2013.

BELGOROSKY, A. et al. Expression of the IGF and the aromatase/estrogen receptor systems in human adrenal tissues from early infancy to late puberty: implications for the development of adrenarche. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 10, p. 51-61, 2009.

BERTHON, A.; MARTINEZ, A.; BERTHERAT, J.; VAL, P. Wnt/beta-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 351, p. 87–95, 2012.

BERTHON, A. et al. WNT/ β -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. **Hum. Mol. Genet.**, v. 23, p. 889–905, 2014.

BICKNELL, A. B. The Tissue-Specific Processing of Pro-Opiomelanocortin. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 692-699, 2008.

BONNET, S. et al. Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with

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

larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and –nonsecreting tumors. **Journal Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 96, p. 419–426, 2011.

CARSIA, R.V et al. Apoptotic cell death in the rat adrenal gland: an in vivo and in vitro investigation. **Cell Tissue Res.**, v. 283, p. 247-254, 1996.

CLEVERS, H.; NUSSE, R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. **Cell.** v. 149, p. 1192–1205, 2012.

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

DRELON, C. et al. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: a WNT perspective. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 408, p. 156-164. 2015.

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

FRANÇA, M. M. et al. POD-1/Tcf21 overexpression reduces endogenous SF-1 and StAR expression in rat adrenal cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 48, p. 1087-1094, 2015.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the Neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 769-778, 2004.

GAUJOUX, S. et al. Beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. **Clin. Cancer. Res.**, v. 17, p. 328–336, 2011.

GHAFFARI, S. Cancer, stem cells and cancer stem cells: old ideas, new developments. **Medicine Reports**, v. 3, n. 23, 2011.

GUASTI, L. et al. Dlk1 upregulates Gli1 expression in male rat adrenal capsule cells through the activation of β 1 integrin and ERK1/2. **Endocrinology**. v. 154, p. 4675–4684, 2013.

HAMMER, G. D. In search of adrenocortical stem and progenitor cells. **End. Rev.**, v. 30, p. 241-263, 2009.

HUANG, C.C.; MIYAGAWA, S.; MATSUMARU, D.; PARKER, K.L.; YAO, H.H. Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by Sonic Hedgehog. **Endocrinology**. v. 151, p. 1119–1128, 2010.

HUGHES, D. P. M. Regulation of NOTCH signaling by reciprocal inhibition of HES1 and Deltex 1 and its role in osteosarcoma invasiveness. **Oncogene**. v. 29, p. 2916–2926, 2010.

JACKSON, S. et al. IGF1 and 2 in two models of adrenal growth. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, p. 399-404, 1991.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr. Rev.**, v. 16, p. 3-34, 1995.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Glândulas Endócrinas. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan. v. 20, p. 390-414, 2004.

KARPAC, J. et al. Development, maintenance, and function of the adrenal gland in early postnatal proopiomelanocortin-null mutant mice. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2555-2562, 2005.

KIM, A. C.; HAMMER, G. D. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 265-266, p. 10-16, 2007.

KIM, A. C. et al. Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. **Development**, v. 135, p. 2593–2602, 2008.

KIM, A. C. et al. In search of adrenocortical stem and progenitor cells. **Endocr. Rev.**, v. 30, p. 241-263, 2009.

KOCH, U.; RADTKE, F. Notch and cancer: a double-edged sword. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 64, p. 2746- 2762, 2007.

KRUDE, H. et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nature Genet.**, v. 19, n. 2, p. 155-157, 1998.

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.

LeROITH, D. Insulin-like growth factor receptors and binding proteins. Baillieres **Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 10, p. 49-73, 1996.

LIU, C.; LI, Y.; SEMENOV, M.; HAN, C.; BAEG, G.H.; TAN, Y.; ZHANG, Z.; LIN, X.; HE, X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. **Cell**, v. 108, p. 837–847, 2002.

LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K. L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell**, v. 77, p. 481–490, 1994.

MARQUES, M. B. O que é células-tronco. 1ª edição, São Paulo, Ed. Brasiliense, 2006. p. 14-26.

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

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.

MENDONÇA, P. O.; COSTA, I. C.; LOTFI, C. F. The involvement of Nek2 and Noct in the proliferation of rat adrenal cortex triggered by POMC – derived. **Plos One**, v. 3, p. 9-10, 2014.

MOORE, A. W. et al. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. **Development**, v. 126, p. 1845–1857, 1999.

MWALE, F. et al. Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. **J. Orthop. Res.**, v. 24, p. 1791-1798, 2006.

NEW, M. I. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. **Annu. Rev. Med.**, v. 49, p. 311-328, 1998.

ORTH, D. N.; KOVACS, W. J. The adrenal cortex. In: WILSON, J. D. et al. **Willians textbook of endocrinology**. 9.ed. Philadelphia: Saunders Book Company, 1998. p. 517-664.

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

PEDERSEN, R. C.; BROWNIE, A. C.; LING, N. Pro-adrenocorticotropin/endorphin-derived peptides: coordinate action on adrenal steroidogenesis. **Science**, v. 208, n. 4447, p. 1044-1046, 1980.

PEDERSEN, R. C.; BROWNIE, A. C. Adrenocortical response to corticotropin is potentiated by part of the amino-terminal region of pro-corticotropin/endorphin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, n. 4, p. 2239-2243, 1980.

PERRONE, R. D.; BENGELE, H. H.; ALEXANDER, E. A. Sodium retention after adrenal enucleation. **Am. J. Physiol.**, v. 250, E1-E12, 1986.

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.

PITETTI, J. L. et al. Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice. **Plos Genet.**, v. 9, p. 45-46, 2013.

RADICE, G. L. et al. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. **Dev. Biol.**, v. 181, p. 64-78, 1997.

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.

REIPRICH, S. et al. SoxE proteins are differentially required in mouse adrenal gland development. **Mol. Biol. Cell.**, v. 19, p. 1575-1586, 2008.

RIBEIRO, T. C.; LATRONICO, A. C. Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 351, p. 96-100. 2012.

RONCHI, C.L.; LEICH, E.; SBIERA, S.; WEISMANN, D.; ROSENWALD, A. Single nucleotide polymorphism microarray analysis in cortisol-secreting adrenocortical adenomas identifies new candidate genes and pathways. **Neoplasia**, v. 14, p. 206–218, 2012.

RYAN, P. D.; GOSS, P. E. The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer. **Oncologist.**, v. 13, p. 16-24, 2008.

SCHWARTZ, NB. et al. AggreCAN is required for growth plate cytoarchitecture and differentiation. **Developmental Biology**, v. 396, p. 224–236, 2014.

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

SKELTON, F. R. Adrenal regeneration and adrenal-regeneration hypertension. **Physiol. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 162-182, 1959.

SIMON, D.P.; HAMMER, G.D. Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 351, p. 2-11, 2012.

SIMONNEAU, J. et al. Cadherin 11 expression marks the mesenchymal phenotype: towards new functions for cadherins?. **Cell. Adhes. Commun.**, v. 3, p. 115-130, 1995.

SIMPSON, E. R.; WATERMAN, M. R. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 50, p. 427-440, 1988.

STEWART, C.E.H.; ROTWEIN, P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. **Physiol. Rev.**, v. 76, p. 1005-1026, 1996.

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 Tissue Res.**, v. 341, n. 2, p. 239-250, 2010.

VAL, P.; MARTINEZ-BARBERA, J. P.; SWAIN, A. Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. **Development**, v. 134, p. 2349–2358, 2007.

VANKELECOM, H.; GREMEAUX, L. Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 166, p. 478-488, 2010.

VELÁZQUEZ-FERNADÉZ, D. et al. Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. **Surgery.**, v. 138, p. 1087-1094, 2005.

VIDAL, V.; SCHEDL, A. Requirement of WT1 for gonad and adrenal development: insights from transgenic animals. **Endocr. Res.**, v. 26, p. 1075–1082. 2000.

WALCZAK, E. M.; HAMMER, G. D. Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. **Nature Rev. Endocrinol.**, v. 11, p. 14-28, 2015.

WHETTON, A. D.; GRAHAM, G. J. Homing and mobilization in the stem cell niche. **Trends Cell. Biol.**, v. 9, n. 6, p. 233-238, 1999.

WIMPENNY, I.; ASHAMMAKHI, N.; YANG, Y. Chondrogenic potential of electrospun nanofibres for cartilage tissue engineering. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 6, p. 536-549, 2002.

WINNAY, J.N.; HAMMER, G.D. Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. **Mol. Endocrinol.**, v. 20, p. 147–166, 2006.

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

WOOD, M.A. et al. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. **Development**, v. 140, p. 4522-4532, 2013.

XING, Y. et al. ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 45, p. 59-68, 2010.

YAMANAKA, S.; TAKAHASHI, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures. **Tanpakushitsu Kakusan Koso.**, v. 51, p. 2346-2350, 2006.

YASWEN, L.; DIEHL, N.; BRENNAN, M. B.; HOCHGESCHWENDER, U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. **Nature Med.**, v. 5, n. 9, p. 1066-1070, 1999.

ZAJICEK, G.; ARIEL, I.; ARBER, N. The streaming adrenal cortex: direct evidence of centripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate. **J. Endocrinol.**, v. 111, n. 3, p. 477–482, 1986.