

GABRIELE EBLING MATTOS

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

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

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Lotfi

São Paulo
2011

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 História e Etimologia

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

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

1.2 A Glândula Suprarrenal Humana

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

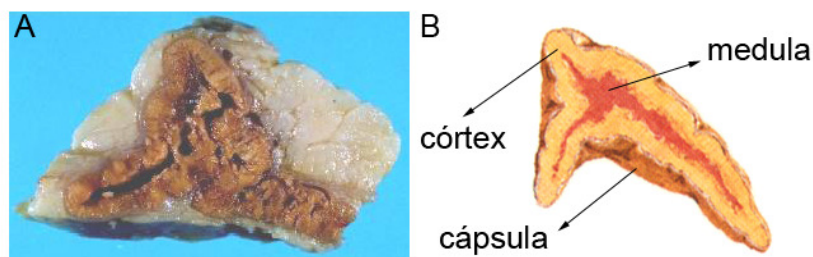


Figura 1: Secção longitudinal de suprarrenal humana indicando cápsula, córtex e medula.

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 A Suprarrenal de Ratos

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

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

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

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

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

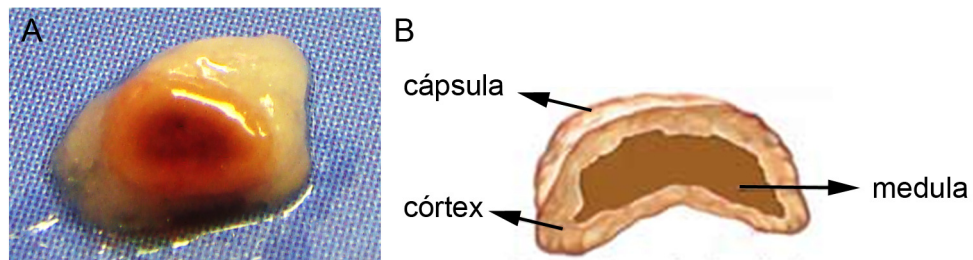


Figura 2: Secção longitudinal de suprarenal de rato indicando cápsula, córtex e medula.
FONTE: **B:** Adaptado de Bowen, 2002.

1.4 Embriologia e Histologia

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

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

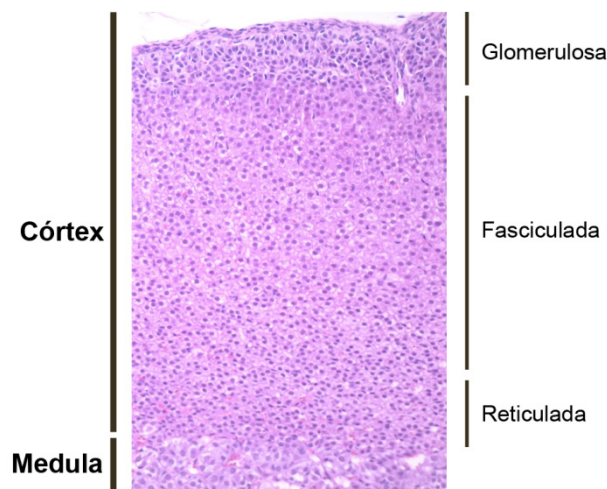


Figura 3: Corte histológico de suprarrenal de rato corado com hematoxilina e eosina. Aumento de 100×.
FONTE: Adaptado de Torres e Lotfi, 2007, com permissão.

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

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

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

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

1.5 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, Eixo HPA

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

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

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

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

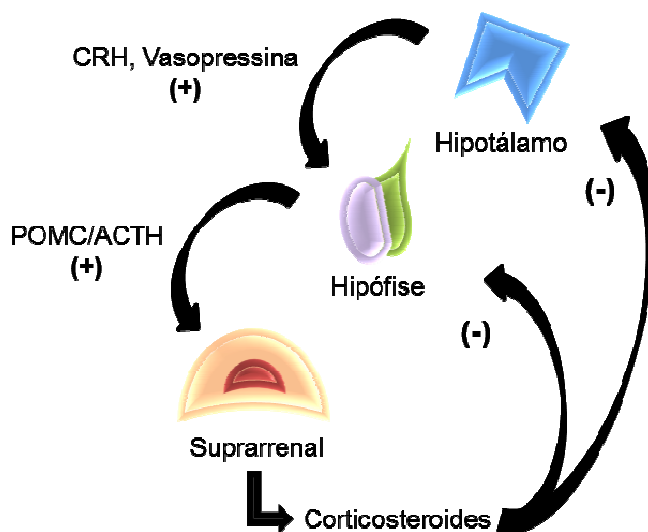


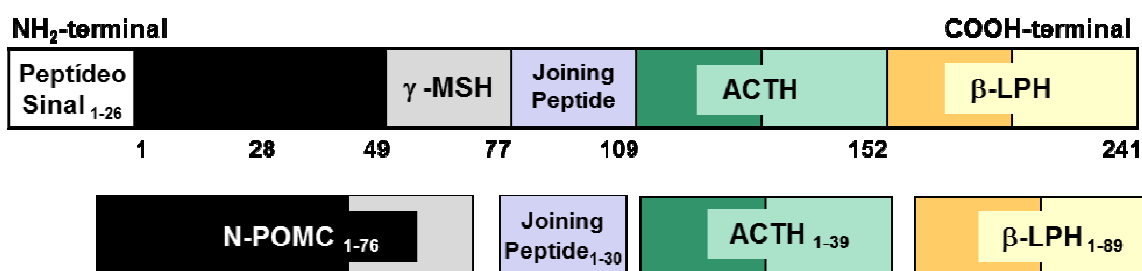
Figura 4: Esquema do eixo HPA mostrando o efeito de retroalimentação negativa (-) por corticosteroides. CRH: Hormônio Liberador de Corticotropina; POMC: Pró-opiomelanocortina; ACTH: Hormônio Adrenocorticotrópico.

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

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

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

- Lobo anterior da hipófise:



- Lobo intermediário da hipófise:

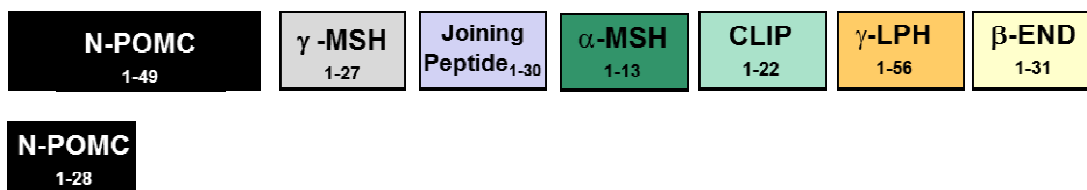


Figura 5: Esquema do processamento da proteína da Pró-opiomelanocortina (POMC) e seus subprodutos nas diferentes etapas. γ-MSH: hormônio estimulador de melanócitos gama; α-MSH: hormônio estimulador de melanócitos alfa; ACTH: hormônio adrenocorticotrópico; β-LPH: lipotropina beta; γ-LPH: lipotropina gama;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

FONTE: Adaptado de Estivariz et al., 1982.

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

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

1.7 O Hormônio Adrenocorticotrópico, ACTH

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

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

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

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

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

1.8 O Fator de Crescimento de Fibroblastos Tipo 2, FGF2

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

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

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

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

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

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

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

1.9 As Vias de Sinalização

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

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

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

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

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

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

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

1.10 As Vias de Sinalização Ativadas pelo ACTH

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

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

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

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

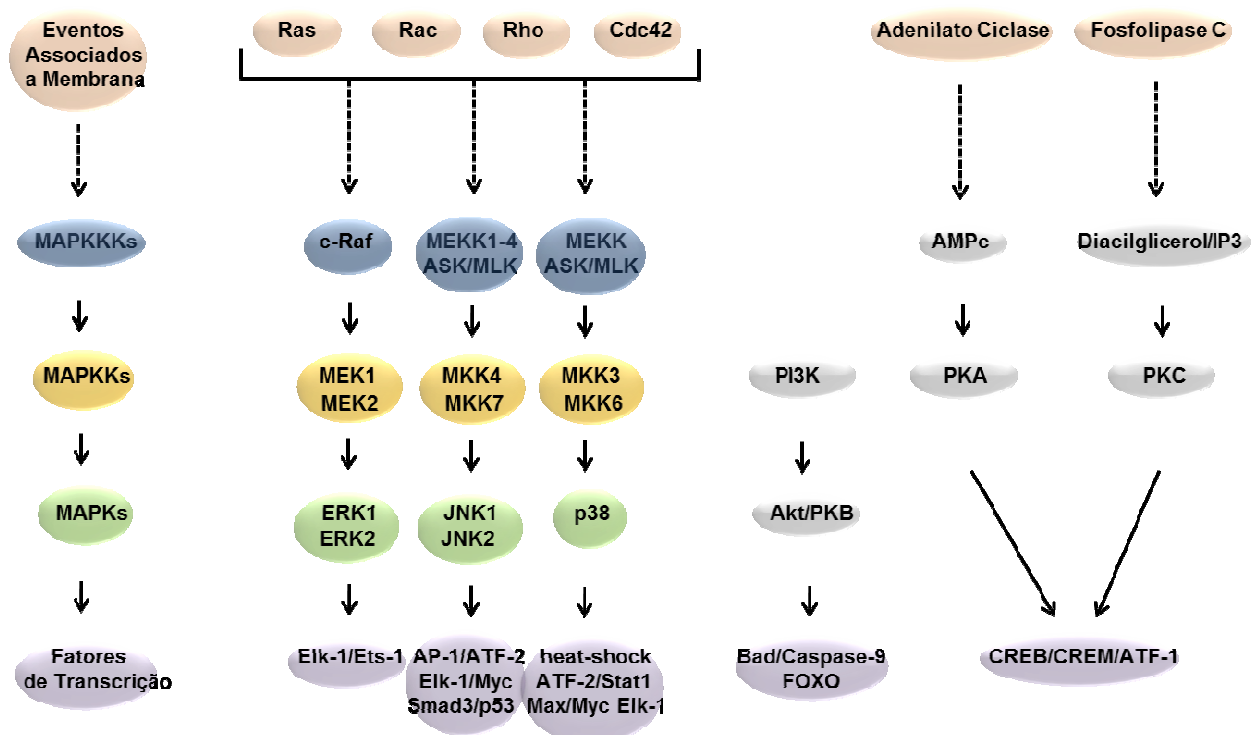


Figura 6: Esquema simplificado das vias de sinalização analisadas.

FONTE: Adaptado de Liu et al., 2007.

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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