

THAIS BARABBA AURICINO

**ESTUDO DA AÇÃO DOS PEPTÍDEOS N- TERMINAL DA POMC
NO CÓRTEX ADRENAL DE CAMUNDONGOS POMC
KNOCKOUT INDUZIDOS POR TAMOXIFENO**

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. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

Versão Original

RESUMO

AURICINO, TB. **Estudo da ação dos peptídeos N-Terminal da POMC no córtex adrenal de camundongos *Pomc* knockout induzidos por tamoxifeno.** 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

O ACTH é considerado o principal fator atuante no desenvolvimento, na manutenção e na esteroidogênese da glândula adrenal. No entanto, existem evidências que peptídeos N-*Pomc*, derivados do processamento da Proopiomelanocortina (POMC), possam atuar na manutenção do córtex adrenal, embora ainda não seja conhecida sua importância e mesmo quais são os peptídeos que atuam na suprarrenal. Nesse trabalho tivemos como objetivo avaliar os efeitos de peptídeos sintéticos de 28 aminoácidos derivados do N-*Pomc* (N-*Pomc*^{Cys}, N-*Pomc*^{Met} e N-*Pomc*^{Ser}) na morfologia e função da suprarrenal de camundongos, cujo gene *Pomc* foi condicionalmente silenciado com Tamoxifeno (Tmx). Foram obtidos animais machos adultos (*CrePomc*^{flox/flox}) com um sistema "knock-out" condicional Cre-Lox induzível por Tmx, que foram tratados através de minibombas osmóticas por 21 dias com os peptídeos ou com salina, e como controle animais *Pomc*^{flox/flox} não tratados. Foram analisados: 1) dados metabólicos; 2) a concentração de ACTH e de corticosterona plasmáticos; 3) a morfologia e a reconstrução anatômica da adrenal; 4) a capacidade funcional através da coloração com *Oil Red O* (ORO) e 5) a capacidade de proliferação através da expressão da proteína PCNA. A caracterização dos animais *CrePomc*^{flox/flox} + Tmx após o silenciamento mostrou a redução de 60% da concentração de ACTH plasmático e esses animais apresentaram 1) redução do gasto energético, aumento da ingestão de alimentos e ganho de peso corpóreo; 2) alteração significativa a área ou o volume das adrenais; 3) redução da produção de gotículas lipídicas e 4) redução do número de núcleos positivos para a proteína PCNA. Esses animais silenciados para a *Pomc* e tratados com os peptídeos N POMC^{Cys} e N-POMC^{Met} apresentaram 1) aumento da corticosterona plasmática e apenas o N-POMC^{Cys} aumentou o ACTH plasmático; 2) aumento de núcleos marcados para PCNA. Concluímos, que os camundongos *Cre Pomc*^{flox/flox} silenciados para a *Pomc* com o Tamoxifeno apresentaram alterações metabólicas, morfológicas e fisiológicas. A análise do efeito biológico dos peptídeos N-POMC mostrou ação desses peptídeos na função e na manutenção do córtex adrenal.

Palavras-chave: Suprarrenal. Eixo HPA. Peptídeos N-terminal POMC. Camundongos *CrePomc*^{flox/flox}.

ABSTRACT

AURICINO, TB. **Study of the action of the N-terminal peptides of the POMC in the adrenal cortex of tamoxifen-induced knockout Pomc mice.** 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

ACTH is considered the main active factor in the development, maintenance and steroidogenesis of the adrenal gland. However, there is evidence that N-Pomc peptides, derived from the processing of Proopiomelanocortin (POMC), may play a role in the maintenance of the adrenal cortex, although their importance is not yet known. In this work we aimed to evaluate the effects of synthetic peptides of 28 amino acids derived from N-Pomc (N-Pomc^{Cys}, N-Pomc^{Met} e N-Pomc^{Ser}) on the morphology and function of the adrenal cortex of mice whose Pomc gene was conditionally silenced with Tamoxifen (Tmx). Adult males (*CrePomc^{flox/flox}*) were obtained with a Tmx inducible Cre-Lox conditional knock-out system, which were treated by osmotic minipumps for 21 days with the peptides or with saline, and as control untreated *Pomc^{flox/flox}* animals. We analyzed: 1) metabolic data; 2) plasma ACTH and corticosterone concentration; 3) the morphology and the anatomical reconstruction of the adrenal; 4) functional capacity through staining with Oil Red O (ORO) and 5) the ability to proliferate through expression of PCNA protein. The characterization of the *CrePomc^{flox/flox}* + Tmx animals after silencing showed a 60% reduction in plasma ACTH concentration and these animals presented 1) reduction of energy expenditure, increased food intake and body weight gain; 2) significant alteration of adrenal area or volume; 3) reduction of the production of lipid droplets and 4) reduction of the number of nuclei positive for the PCNA protein. These animals that were silenced to Pomc and treated with peptides N-Pomc^{Cys}, N-Pomc^{Met} had 1) increase in plasma corticosterone and only N-POMC^{Cys} increased plasma ACTH; 2) increase of nuclei marked for PCNA. We conclude that *CrePomc^{flox/flox}* mice silenced for Pomc with Tamoxifen presented metabolic, morphological and physiological alterations. The analysis of the biological effect of N-POMC peptides showed the action of these peptides on the function and maintenance of the adrenal cortex.

Palavras-chave: Adrenal. HPA axis. N-terminal POMC peptides. Mice *CrePomc^{flox/flox}* .

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Glândula Suprarrenal

As glândulas suprarrenais estão localizadas nos polos superiores de cada rim, e apresentam coloração castanha amarelada devido a presença de lipídeos (Figura 1). É uma glândula formada por dois tecidos de origem embriológica diferentes, que compõem duas regiões, o córtex e a medula, contidos por uma cápsula conjuntiva. A medula adrenal, que é produtora de catecolaminas, tem origem embrionária na neuroectoderme e está disposta em cordões de células cromafins e células neurais circundadas por capilares sanguíneos. O córtex da adrenal tem origem na mesoderme, cujas células irão se diferenciar em três tipos celulares que formarão três zonas concêntricas chamadas de zona Glomerulosa, zona Fasciculada e zona Reticulada, representadas na Figura 2.

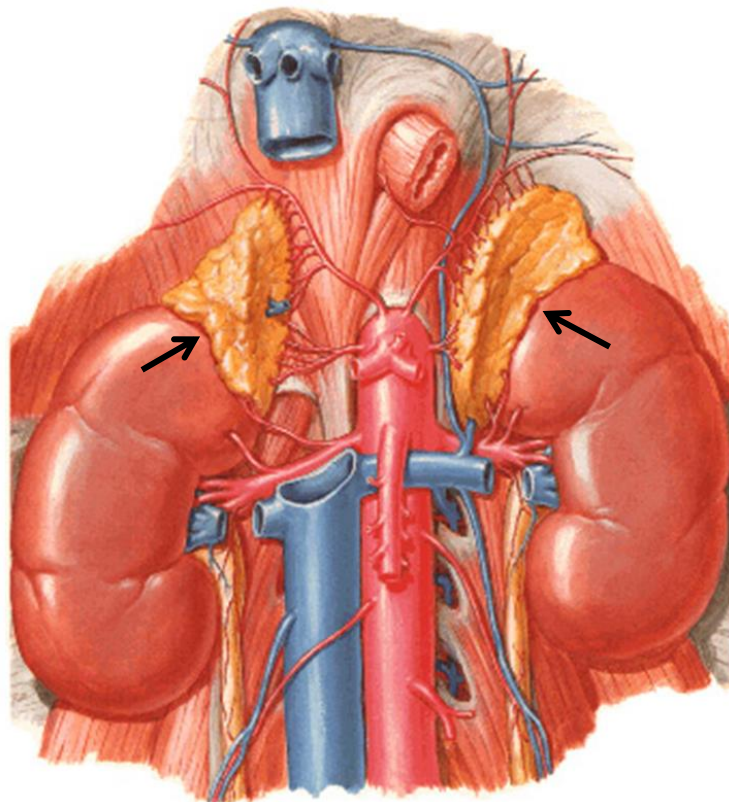


Figura 1– Imagem ilustrativa da glândula suprarrenal localizada sobre os rins, em uma vista anterior. Adaptado de NETTER, 2011.

A zona Glomerulosa está localizada na região mais externa do córtex, e é a região adjacente à cápsula conjuntiva. Suas células com núcleo esférico único e citoplasma acidófilo formam aglomerados arredondados que são responsáveis pela produção e secreção de mineralocorticoides, como a aldosterona. A liberação desses hormônios é controlada pelo sistema renina-angiotensina e pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A zona Fasciculada, que corresponde à zona intermediária do córtex, é a maior, e ocupa 75% de todo o volume do córtex adrenal. Suas células são arranjadas em colunas paralelas, perpendiculares à superfície da glândula, intercaladas por capilares. São células poliédricas com citoplasma levemente basófilo e alta concentração de lipídeos. Essa zona é responsável pela secreção de glicocorticoides, como a corticosterona em murinos e cortisol em humanos, que estimulam a síntese e armazenamento do glicogênio, o metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, além de inibirem a utilização da glicose pelos tecidos periféricos. Essa zona está sob controle do ACTH que regula a produção e liberação dos hormônios glicocorticoides. A zona mais interna do córtex adrenal é a zona Reticulada, localizada adjacente à medula, composta por células menores, arranjadas na forma de rede por cordões entrelaçados, com núcleo picnótico e citoplasma eosinófilo. Apresenta baixa concentração de lipídeos e é responsável pela síntese e secreção da dehidroepiandrosterona (DHEA) e estrógenos em humanos.

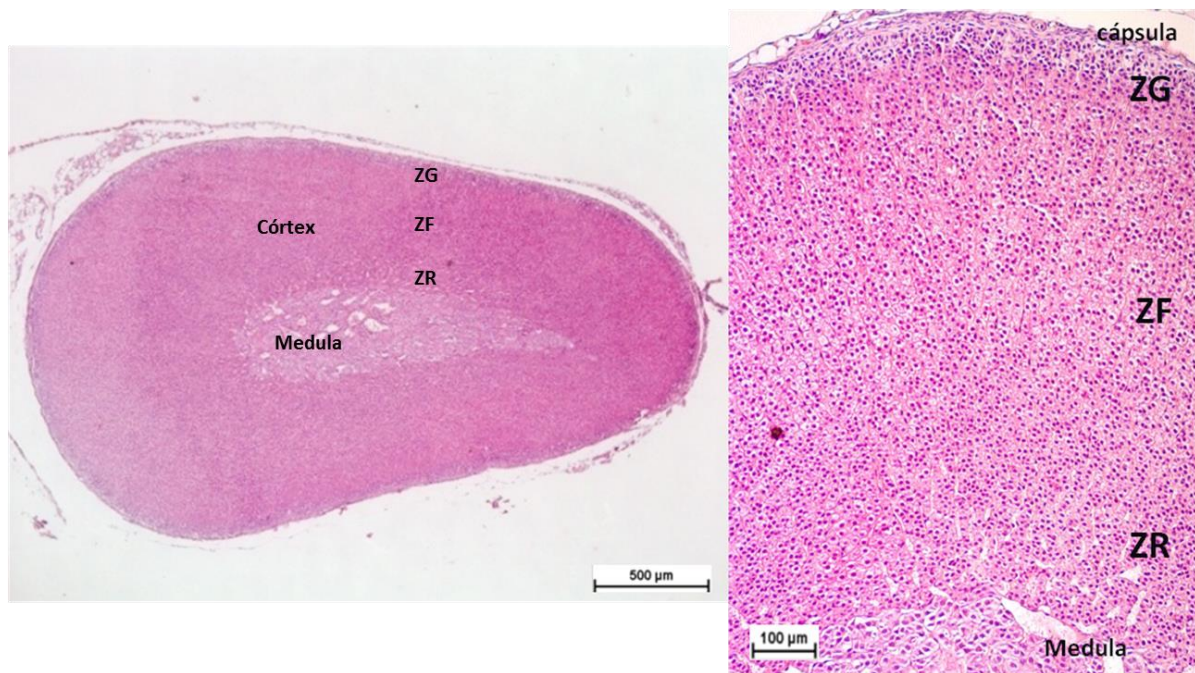


Figura 2 – Fotomicrografia representativa da glândula adrenal de rato. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina para a identificação das 3 diferentes zonas do córtex da suprarrenal, ZG = zona Glomerulosa; ZF= zona Fasciculada; ZR= zona Reticulada, e da Medula. Adaptado de Torres e colaboradores (2007).

1.2 O Eixo Hipotálamo- Hipófise- Suprarrenal

Estímulos fisiológicos ou patológicos podem alterar a função da suprarrenal que está sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (eixo HPA). Diferentes estímulos ativam os núcleos hipotalâmicos paraventricular e supraóptico a secretar vasopressina e o hormônio liberador de corticotropina (CRH) (ORTH & KOVACS, 1998). O CHR liberado no sistema porta hipofisário estimula os corticotrofos, localizados na adenohipófise, a produzir e secretar o ACTH. O ACTH é reconhecido pelo receptor específico denominado receptor de melanocortina 2 (MC2R) presente nas células do córtex adrenal, que depois de ativados desencadeiam uma sinalização que resulta na produção de hormônios esteroides. A inibição do eixo HPA ocorre por retroalimentação negativa (Figura 3) pela ação dos glicocorticoides no hipotálamo e na adenohipófise, que cessam a produção do CRH e do ACTH (PAPADIMITRIOU & PRIFTIS, 2009).

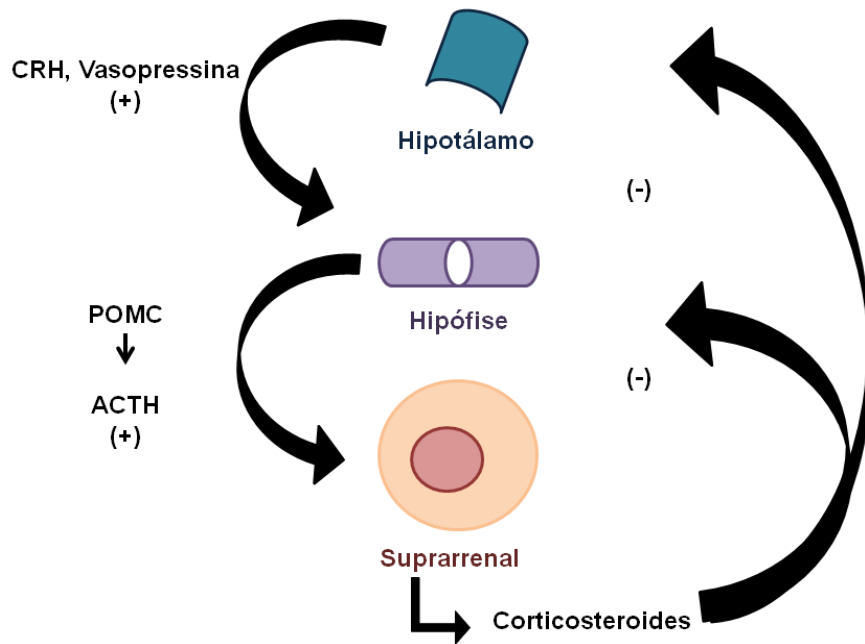


Figura 3 – Esquema da composição do eixo HPA (Hipotálamo – Hipófise – Adrenal) e a representação da retroalimentação negativa. CRH: Hormônio liberador de corticotropina; POMC: Pró-opiomelanocortina; ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico.

1.3 A ação do ACTH no córtex da suprarrenal

O ACTH é um peptídeo de 39 aminoácidos, conhecido como principal regulador do crescimento, manutenção e função da glândula adrenal, que após se ligar ao receptor MC2R estimula, por exemplo, a produção de cortisol em humanos e corticosterona em murinos. Altos níveis de ACTH circulante promovem um aumento do número (hiperplasia) e no tamanho (hipertrofia) das células do córtex da suprarrenal (NEW, 1998; DALLMAN, 1984). No entanto, doses fisiológicas de ACTH *in vivo* não induzem o crescimento compensatório da adrenal após adrenalectomia parcial (DALLMAN *et al.*, 1980). *In vitro*, ACTH inibe a proliferação de células adrenais (MASUI & GARREB, 1971; RAMACHANDRAN & SUYAMA, 1976; MATTOS *et al.*, 2005) ou é um mitogênico fraco em linhagem de tumor de camundongo, células Y1 (LOTFI *et al.*, 1997). Estudos que utilizaram anticorpos para neutralizar o ACTH circulante, tiveram como resultado a redução nos níveis de esteroides, mas não a atrofia da glândula adrenal (RAO *et al.*, 1978). Outra evidência mostrou que

peptídeo N-terminal da POMC tem efeito mitogênico e parecem ser mais potentes do que o ACTH *in vivo* (ESTIVARIZ *et al.*, 1982). Em conjunto, esses resultados suportam a hipótese que outros peptídeos derivados do pró-hormônio precursor do ACTH denominado pró-opiomelanocortina (POMC) possam estar envolvidos na manutenção da glândula adrenal (ESTIVARIZ *et al.*, 1982).

1.4 Pró-opiomelanocortina (POMC)

A Pró-opiomelanocortina (POMC) é um pró-hormônio de 241 aminoácidos produzido principalmente pela hipófise. Além da hipófise, a POMC é encontrada em tecidos como pele, intestino, hipotálamo, pâncreas e pulmão (SMITH *et al.*, 1988). Após processamento da POMC em sítios específicos da molécula por duas enzimas pró-hormônio convertases 1 e 2, PC1 e PC2, são produzidos vários peptídeos menores (Figura 4). As enzimas PC1 e PC2, que são expressas, respectivamente, nos lobos anterior e intermediário da hipófise, são responsáveis pela clivagem da POMC, gerando o ACTH, a lipotropina (LPH), o "Joining Peptide" (JP), o hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH) e a beta-endorfina (β -END). Além desses peptídeos, a POMC gera no lobo anterior da hipófise um peptídeo de 76 aminoácidos da região N-terminal da POMC, o peptídeo N-POMC1-76 ou também chamado de pró- γ -MSH. Esse peptídeo ainda pode sofrer, no lobo intermediário, uma clivagem que resulta no peptídeo N-POMC1-49 (BICKNELL, 2008). Portanto, os peptídeos N-terminais da POMC circulantes são provavelmente os pró- γ -MSH ou N-POMC1-76 e o N-POMC1-49.

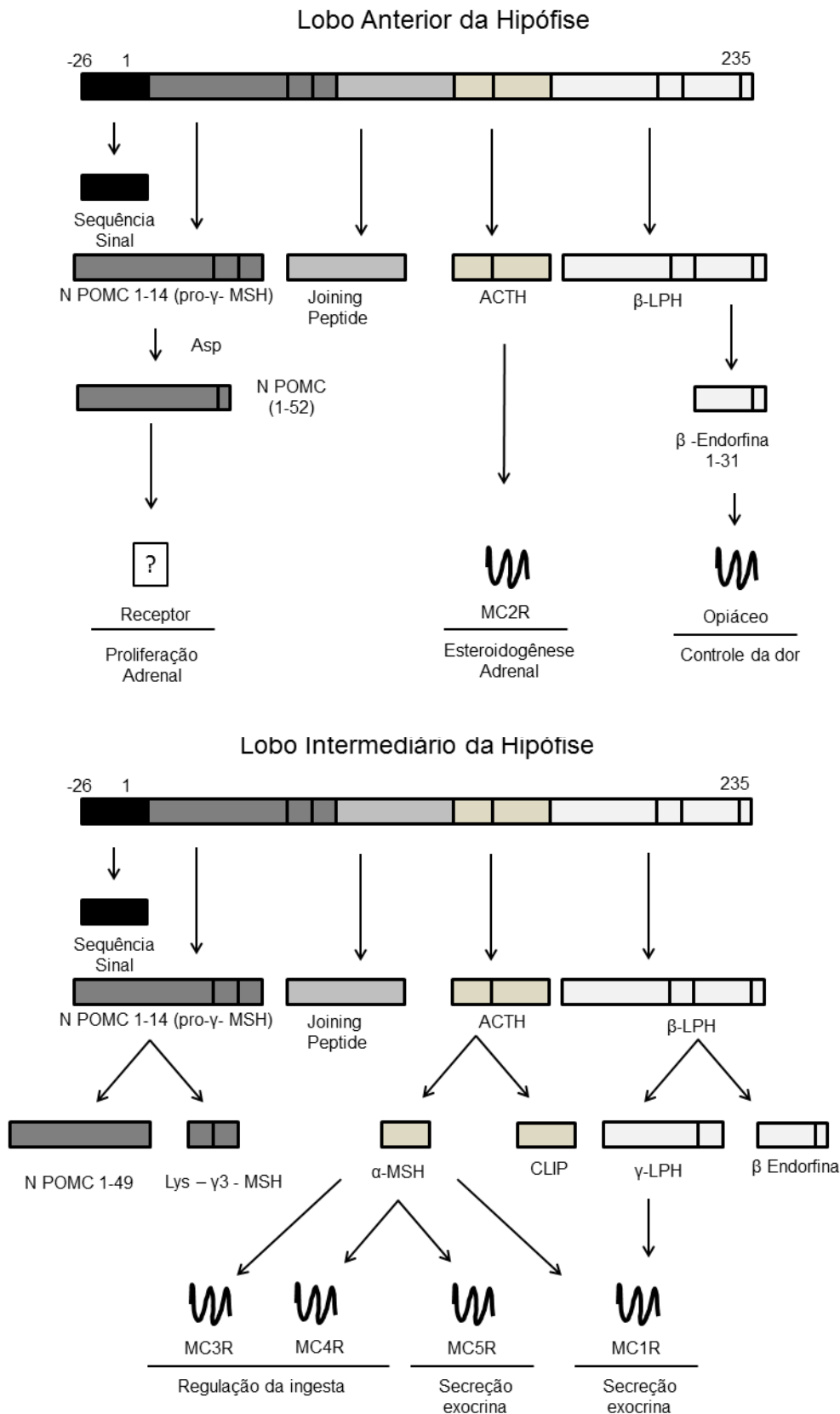


Figura 4- Processamento da Pró-opiomelanocortina (POMC) no lobo anterior e intermediário da hipófise, o papel fisiológico dos peptídeos resultantes, e os receptores. N-POMC: Peptídeos N-terminais da POMC; ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico; CLIP: Peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotropina; LPH: Lipotropina; MSH: Hormônio estimulador de melanócitos. Fonte: Adaptado de Bicknell, 2008.

1.5 O peptídeo NH₂-Terminal da POMC (N-POMC)

Os peptídeos N-POMC têm sido descritos como estimuladores da proliferação de células adrenocorticais (ESTIVARIZ *et al.*, 1982; LOWRY *et al.*, 1983). No entanto, a administração do peptídeo N-POMC1-76 não apresentou efeito mitogênico nas glândulas de ratos hipofisectomizados (ESTIVARIZ *et al.*, 1982), nem nos tratados com dexametasona (DEX) (SEIDAH *et al.*, 1981). Por outro lado, os peptídeos N-POMC 1-28 e N-POMC 2-54, isolados de extratos de hipófises, foram mitogênicos potentes quando utilizados *in vitro* (ESTIVARIZ *et al.*, 1982) e *in vivo* (ESTIVARIZ *et al.*, 1988). Embora o N-POMC 1-28 não seja um peptídeo endógeno, tem sido utilizado para mostrar um efeito mitogênico dos N-POMCs. Portanto, a porção de 28 aminoácidos da porção N-terminal da POMC parece ser suficiente para desencadear a proliferação das células adrenais em modelos *in vivo* (TORRES *et al.*, 2010; MENDONÇA & LOTFI, 2011). Além disso, resultados do nosso grupo mostraram um efeito anti-apoptótico de N-POMC 1-28 nas glândulas adrenais de ratos que foram hipofisectomizados (TORRES *et al.*, 2010). De acordo com Pepper & Bicknell (2009), as células Y1 estimuladas por peptídeos sintéticos, N-POMC 1-28 e N-POMC 1-49, resultou em um aumento na fosforilação de ambos os ERKs 1 e 2, bem como seus reguladores, MEK e c-RAF.

Estudos da estrutura do peptídeo N-terminal da POMC, que foi isolado de hipófise humana e purificado, apresentou uma conformação terciária dependente de pontes dissulfeto entre as cisteínas Cys-2-Cys-24 e Cys-8-Cys-20. Além disso, foi proposta a presença de dois locais de glicosilação nesta molécula (BENNETT *et al.*, 1986). A síntese do peptídeo de 28 aminoácidos N-terminal da POMC (1-28N-POMC) contendo as pontes dissulfeto Cys-2-Cys-24 e Cys-8-Cys-20, mostrou ser mitogênico em uma linhagem de células tumorais humanas, células H295R (FASSNACHT *et al.*, 2003) e em culturas de células normais de adrenais de rato (MATTOS *et al.*, 2005). Além disso, ratos tratados com dexametasona (DEX) para inibição do eixo HPA e peptídeos 1-28N-POMC^{Cys} e com outro

com as cisteínas substituídas por metionina (1-28N-POMC^{Met}), induziram a entrada em fase S do ciclo celular em todas as zonas do córtex adrenal (TORRES *et al.*, 2010). Esse conjunto de resultados mostrou que provavelmente seria necessária à clivagem do pró- γ -MSH no tecido alvo para que fossem produzidos peptídeos menores da região N-terminal para a estimulação da proliferação ou efeito mitogênico das células adrenocorticais (ESTIVARIZ *et al.*, 1982; LOWRY *et al.*, 1983). Em resposta à essa possibilidade BICKNELL e colaboradores (2001) caracterizaram uma enzima serina protease (AsP), presente na matriz extracelular das células adrenais, responsável por clivar o pró- γ -MSH, cujo produto provável é um peptídeo N-POMC com 52 resíduos capaz de estimular a proliferação das células do córtex adrenal. Estes estudos demonstram a capacidade dos primeiros aminoácidos, 1-28N-POMC, de estimular uma sinalização envolvida com a proliferação celular e com a indução do crescimento celular (BICKNELL, 2016), dos quais mecanismos envolvidos nesses efeitos ainda não estão elucidados.

1.6 Alterações envolvidas no processamento da POMC

Está bem estabelecida a ação do ACTH para a produção de esteroides na glândula suprarrenal, assim como a do α -MSH na pigmentação da pele e no equilíbrio do gasto energético. Os receptores responsáveis pela ligação do ACTH e do α -MSH, pertencem a família de 5 receptores, acoplado a proteína G e nomeados receptor de melanocortina (MC1-5 R) (MOUNTJOY *et al.*, 1992). O MC2R é expresso no córtex adrenal e em adipócitos em roedores (MOUNTJOY *et al.*, 1992). O α -MSH desempenha um papel fundamental no controle da alimentação e peso, ou seja, atua diretamente na regulação do apetite, sendo ativado pelos receptores MC3 e MC4 (MAC NEIL *et al.*, 2002). Modificações na POMC ou nas convertases PC1 e PC2 podem desencadear alterações metabólicas e fisiológicas em murinos ou em humanos (KRUDE *et al.*, 2003). Deleções ou mutações que podem afetar o gene POMC, causam deficiência na função adrenal, bem como defeito na

pigmentação da pele, além da obesidade extrema e hipocortisolismo (KRUDE *et al.*, 1998; KRUDE *et al.*, 2003). Além disso, alterações no processamento da POMC pode desencadear deficiência de peptídeos resultante da sua clivagem, como o α -MSH, resultando principalmente na falta de controle do consumo alimentar, alterações de pigmentação capilar, hipersecreção crônica do cortisol associado à síndrome de Cushing, e acúmulo de gordura visceral (MAYO-SMITH *et al.*, 1989). Portanto, o fenótipo associado a um defeito na função da POMC, pode incluir principalmente a obesidade, alteração da pigmentação e deficiência de ACTH e conseqüentemente na esteroidogênese adrenal (COLL *et al.*, 2004).

Neonatos de camundongos “*knock-out*” (KO) para a *Pomc* apresentam atrofia da zona fasciculada, e após cinco semanas do nascimento foi observada uma atrofia severa de todo o órgão, refletindo a dependência dos peptídeos derivados da POMC para a manutenção da adrenal (KARPAC *et al.*, 2005). Enquanto a atrofia da glândula adrenal ocorre principalmente devido ao aumento na taxa de morte celular por apoptose em animais hipofisectomizados ou tratados com DEX (WYLLIE *et al.*, 1973; ZAJICEK *et al.*, 1986; TILLY; HSUEH, 1993; TORRES *et al.*, 2010), nos animais KO *Pomc*, a atrofia adrenal parece estar relacionada à diminuição da proliferação das células adrenocorticais, e não à apoptose (KARPAC *et al.*, 2005). SMART e colaboradores (2006) mostraram que camundongos *Pomc* *-/-* desenvolvem obesidade com hiperfagia e diminuição da taxa metabólica apesar da ausência de glicocorticoides circulantes. De maneira geral, os animais KO *Pomc* apresentaram uma sobrevivência muito baixa (8%) e apresentaram alterações na morfologia e função da glândula adrenal devido à falta de peptídeos derivados da *Pomc*, desde o período fetal (YASWEN *et al.*, 1999). Além disso, camundongos KO *Pomc* que sobreviveram à fase adulta apresentaram obesidade, defeitos na pigmentação e insuficiência adrenal severa (CHALLIS *et al.*, 2004; YASWEN *et al.*, 1999). COLL e colaboradores (2006) mostraram que a administração do peptídeo sintético 1-28N-POMC em animais KO *Pomc* não alterou a

morfologia nem a função da glândula adrenal, mas inibiu a ingestão de alimentos e o peso corpóreo dos camundongos. Portanto, novos modelos de camundongos KO para *Pomc* são necessários para o estudo da sua função no córtex adrenal em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal, bem como do efeito de diferentes tipos de peptídeos N-terminal da POMC na suprarrenal. Foi idealizado pelo nosso grupo um camundongo cujo gene da *Pomc* pudesse ser silenciado condicionalmente. Portanto, foram obtidos camundongos derivados de camundongos com o gene da *Pomc* flanqueado por sequências LoxP em homozigose. Esses animais foram cruzados com animais com a enzima Cre recombinase transcrita sob controle de um promotor do gene da ubiquitina C, expresso em todos os tecidos do animal, e que é ativada apenas por Tamoxifeno (Tmx). Dados ainda não publicados sobre a caracterização das linhagens de camundongos geneticamente modificados, foram obtidos através da análise do DNA gnômico de cada uma das linhagens. Além disso, a hipófise dos animais foi analisada por imunofluorescência quanto a expressão das proteínas POMC e um dos seus sub-produtos, a β -Endorfina, que apresentaram níveis reduzidos devido à administração do tamoxifeno (Tmx). Com a caracterização desses camundongos knock-out induzíveis para o gene da *Pomc* estabelecida, tivemos como hipótese que os peptídeos N-terminal da POMC, a exemplo do que preliminarmente observamos para os peptídeos N-POMC1-28, podem ser importantes na manutenção do córtex adrenal bem como na modulação do estado funcional do córtex adrenal desses animais.

CONCLUSÃO

- Os camundongos Cre *Pomc*^{flox/flox} silenciados para a *Pomc* com o Tamoxifeno apresentaram uma diminuição do ACTH plasmático, aumento de peso, consumo alimentar e diminuição no gasto energético, portanto alterações metabólicas e fisiológicas.
- O silenciamento do gene da *Pomc* resultou na redução na área e volume gândula adrenal, além de, uma diminuição da capacidade de produção/secreção dos esteroides e redução do número de células em proliferação no córtex adrenal.
- A análise do efeito biológico dos peptídeos N-POMC^{Cys} e de N POMC^{Met} mostrou que ambos regularam a função esteroidogênica da adrenal, enquanto o peptídeo N-POMC^{Cys} estimulou a produção de ACTH, por mecanismos ainda não descritos.
- Os peptídeos N-POMC^{Cys} e N POMC^{Met} apresentaram efeito mitogênico e de proliferação nas zonas mais externas do córtex adrenal, sugerindo uma ação desses peptídeos na manutenção do córtex adrenal.

REFERÊNCIAS*

AL-DUJAILI, E. A. JI. et al. Circulating human pituitary pro-gamma-melanotropin enhances the adrenal response to ACTH. **Nature.**, 29. p.156-159, 1981.

BENNETT,H.P, et al. Reinvestigation of the disulfide bridge arrangement in human pro-opiomelanocortin N-terminal segment (hNT 1-76). **International Journal of Peptide and Protein Research.**, v. 27, p. 306-313, 1986.

BICKNELL, A.B. et al. Characterization of a Serine Protease that Cleaves Pro- γ -Melanotropin at the Adrenal to Stimulate Growth. **Cell.**, V.105, n. 7, p 903-912, 2001.

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

BICKNELL, A.B. 60 years of POMC: N-terminal POMC peptides and adrenal growth. **Journal of Molecular Endocrinology**, 56, p39-48, 2016.

CATHIARD, A.M. et al. Effects of several pro-opiomelanocortin derived peptides on steroidogenesis in ovine and bovine adrenal cells. *Journal of Steroid Biochemistry.*, v.23, p. 185-190, 1985.

CHALLIS, B. G., et al.. Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). **Proc Natl Acad Sci USA.**, v 101, p 4695-700, 2004.

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

COLL, A. P., FAROOQI, I. S., CHALLIS, B. G., YEO, G. S. & O'RAHILLY, S. Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.**, v. 89, p. 2557-62, 2004.

- COLL, A. P., et al. The effects of proopiomelanocortin deficiency on murine adrenal development and responsiveness to adrenocorticotropin. **Endocrinology**, v.145, p. 4721-7, 2004.
- DALLMAN, M. F. et al. Adrenocorticotropin Inhibits Compensatory Adrenal Growth after Unilateral Adrenalectomy. **Endocrinology**, v 107, n. 5, p.1397–1404, 1980.
- DALLMAN, M.F, et al. Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food”. **PNAS**. v. 100, n. 5865, p. 11696–11701, 2003.
- ESTIVARIZ, F. E. et al. Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides. **Nature**, v. 297, n. 5865, p. 419-422, 1982.
- ESTIVARIZ F.E. et al. Further evidence that N589 terminal pro-opiomelanocortin peptides are involved in adrenal mitogenesis. **Journal of Endocrinology**. v, 116 p. 201-206, 1988a.
- ESTIVARIZ F.E. et al. Adrenal regeneration in the rat is mediated by mitogenic N-terminal pro-opiomelanocortin peptides generated by changes in precursor processing in the anterior pituitary. **Journal of Endocrinology** v. 116 p. 207-216. 1988b.
- FASSNACHT, M. et al. N-terminal proopiomelanocortin acts as a mitogen in adrenocortical tumor cells and decreases adrenal steroidogenesis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, p. 2171-9, 2003.
- 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. 2555-62, 2005.
- KRUDE, H et al, A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nature Genet**. v. 19, p. 155-157, 1998.
- KRUDE, H. et al. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, p. 4633-40, 2003.

LERARIO, A. M. et al. Molecular Mechanisms of Stem/Progenitor Cell Maintenance in the Adrenal Cortex. **Front Endocrinol.**, v 8, n. 52, 2017.

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

LOWRY, P, J.et al. Pro-gamma-melanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth. **Nature**, v. 360, n.5938, p. 70-73, 1983.

MAC NEIL et al. The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. **European Journal of Pharmacology.**, v.450, n.1, p. 93-109, 2002.

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

MATTOS, G. et al., Comparative effect of FGF2, synthetic 1-28 N POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures. **Cell Tissue Res.**, v. 345, n. 3, p. 343-256, 2011.

MATTOS, G. E., 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, p. 343-356, 2011.

MASUI, H. & GARREN, L. D. On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone. The stimulation of thymidine kinase activity with altered properties and changed subcellular distribution. **J Biol Chem**, v. 246, p. 5407-5413, 1971.

MAYO-SMITH, W., et al. Body fat distribution measured with CT: correlations in healthy subjects, patients with anorexia nervosa, and patients with Cushing syndrome. **Radiology.** V.170, p.515–518, 1989.

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

MENDONÇA, P.O. et al., N-POMC1–28 increases cyclin D expression and inhibits P27kip1 in the adrenal cortex. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 371, p. 166-173. 2013.

MEHLEM, A. et al. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nature Protocols**. n. 8, p. 1149–1154, 2013.

MORLEY, S. D et al.. Variegated expression of a mouse steroid 21-hydroxylase/ β -galactosidase transgene suggests centripetal migration of adrenocortical cells. **Mol. Endocrinol.** v. 10, n. 5, p.585-598, 1996.

MOUNTJOY K.G. Et al. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. **Science**.v. 257, p.1248–51, 1992.

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

NETTER, F.H. **Atlas de Anatomia Humana**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ORTH, D. N; KOVACS, W. J. The adrenal cortex. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D.W.; KRONERBERG, H. M.; LARSER, P.R. **Willians textbook of endocrinology**. 9th ed. Philadelphia: Saunders Book Company. P 517-664,1998.

PAPADIMITRIOU & PRIFTIS. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. Logo **Neuroimmunomodulation.**, v. 16, N. 5, p. 265–271, 2009.

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

PEPPER, D.J; BICKNELL, A.B. The stimulation of mitogenic signaling pathways by N-POMC peptides. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.300, p.77–82, 2009.

RAMACHANDRAN J. & SUYAMA, A. T. Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, n. 72, p. 113-117 (1976).

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.

ROSS, T.J. et al. Infusion of N-Proopiomelanocortin-(1–77) Increases Adrenal Weight and Messenger Ribonucleic Acid Levels of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase in the Sheep Fetus during Late Gestation. **Endocrinology**, v. 141, n. 6, p. 2153–2158, 2000.

SEIDAH, N. G. & CHRETIEN, M. Complete amino acid sequence of a human pituitary glycopeptide: an important maturation product of pro-opiomelanocortin. **Proc Natl Acad Sci USA**, 78, p. 4236-40, 1981.

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

SMART, J.L. Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 2, 2006.

SMITH AI, FUNDER JW. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. **Endocr Rev.**, v. 9, p.159-79, 1988.

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

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.

TILLY, J. L.; HSUEH, A. J. Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. **J Cell Physiol**, v. 154, n. 3, p. 519-26, 1993.

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

WOOD, M. A. et al. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. **Development.**, n.140, p. 4522-32, 2013.

WYLLIE, A. H. *et al.* Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. **J Pathol**, v.111, n. 2, p. 85-94, 1973.

XING, Y., LERARIO, A. M., RAINEY, W. & HAMMER, G. D. 2015. Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 44, 243-74.

YASWEN, L. et al. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. **Nat Med**, v. 5, n. 9, p. 1066-70, 1999.

ZAJICEK, G.; ARIEL, I.; ARBER, N. The streaming adrenal cortex: direct evidence of entripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate. **J Endocrinol**, v. 111, n. 3, p. 477-82, 1986.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724:
Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.