#### THAIS BARABBA AURICINO

# ESTUDO DA AÇÃO DOS PEPTÍDEOS N- TERMINAL DA POMC NO CÓRTEX ADRENAL DE CAMUNDONGOS POMC KNOCKOUT INDUZUDOS 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.

#### THAIS BARABBA AURICINO

#### ESTUDO DA AÇÃO DOS PEPTÍDEOS N- TERMINAL DA POMC NO CÓRTEX ADRENAL DE CAMUNDONGOS POMC KNOCKOUT INDUZUDOS 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

# CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

#### Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Barabba Auricino, Thais
ESTUDO DA AÇÃO DOS PEPTÍDEOS N- TERMINAL DA POMC
NO CÓRTEX ADRENAL DE CAMUNDONGOS POMC KNOCKOUT
INDUZUDOS POR TAMOXIFENO / Thais Barabba Auricino;
orientadora Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco
Lotfi. -- São Paulo, 2018.
63 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

 Suprarrenal. 2. Eixo HPA. 3. Peptídeos Nterminal POMC. 4. Camundongos CrePomcflox/flox.. 5.
 ACTH. I. Ferini Pacicco Lotfi, Profa. Dra. Claudimara, orientador. II. Título.

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Thais Barabba Auricino
	ção/Tese: Estudo da ação dos Peptídeos N-Terminal da POMC no córte dongos <i>Pomc knockout</i> induzidos por tamoxifeno.
Orientador(a): Pro	ofa. Dra. Claudimara Feirini Pacicco Lotfi
	adora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, de Mestrado em sessão de mostrado em se de mostrad
	( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)
Nome:	sinatura:
Nome:	sinatura:
Nome:	sinatura:
	natura:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.017/2016

#### DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 091/2013/CEUA, datado de 19/08/2013, e por solicitação da Profa. Dra. Claudimara F. Pacicco Lotfi, do Departamento de Anatomia, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) Thais Barabba Auricino, aprovada no programa de Pós-graduação Ciências Morfofuncionais, em nível de mestrado, ao Projeto de Pesquisa "O papel dos peptideos derivados da POMC na diferenciação e função do córtex adrenal", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador da CEUA-ICB/USP

#### **DEDICATÓRIA**

Aos Meus pais, Sergio e Rosana, Ao meu irmão, Thiago, Ao meu Avô, Miguel (in memorian), Dedico este trabalho.

#### **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, á Deus toda a minha gratidão.

Á minha orientadora Prof. Dra. Claudimara Lotfi, pela oportunidade, dedicação e paciência durante todo o trabalho, obrigada por todos os ensinamentos.

Aos meus pais, Sergio e Rosana, e ao meu irmão Thiago, que não pouparam esforços para que esse sonho fosse realizado, obrigado pelo apoio, paciência e o amor incondicional.

Aos meus amigos do Laboratório de Estrutura e Função Celular: Bah, Jeanzito,
Passaia (fofuxa), Duda, Isadora, Ismael, Thabata e Pedro, obrigado pela ajuda, risadas e
brincadeiras. O dia a dia se tornou leve com a presença de todos vocês.

Aos Professores que fizeram parte da minha banca de qualificação: Prof. Dra. Renata Frazão, Prof. Dra. Camila Dale e Prof. Dra Ericka Trarbach, pelas sugestões e comentários.

Ao Dr. Jose Donato Junior e a equipe do Laboratório de Neuroanatomia Funcional –

Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB-USP, pelo uso do CLAMS e por todo

aprendizado.

Ao Dr. Jackson Cioni Bittencourte a equipe do Laboratório de Neuroanatomia Química - Departamento de Anatomia – ICB-USP, pelo uso do Criostato e Neurolucida.

Á Marta Maria da Silva Riguetti, responsável pelo Laboratório Multiusuário de Histologia e Microscopia Eletrônica, pelo auxilio e disponibilidade em técnicas de histologia e coloração.

Á todos os Professores do Departamento de Anatomia, que contribuíram de forma direta e indireta em meu trabalho.

.

Á minha avó Rozalia, obrigada pelos mimos, amor e carinho.

Ás minhas primas Beatriz, Giovanna, Carol e minha cunhada Mandy, obrigado por todo apoio e incentivo, a presença de vocês foi essencial. Aos meus amigos Karina, Rubia, Rodrigo, Mariana, Duda, Vanessa e Fernanda obrigada pela presença nos melhores e piores momentos. Á minha queria amiga Erika pelo carinho e ajuda muito obrigado. Á toda minha família e amigos que sempre estiveram presentes nessa trajetória. Agradeço pelo apoio e carinho.

Aos meus colegas de departamento pelo apoio e momentos de descontração.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia, pelo auxilio e cuidado com os animais utilizados nestes experimentos.

Aos funcionários de limpeza e segurança do ICB pelo seu trabalho.

Á CAPES pelo investimento de 2 anos.

Á FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos animais de experimentação.

### Epigráfe

"Tudo posso naquele que me fortalece."

#### **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<sup>Cys</sup>. N-Pomc<sup>Met</sup> e N-Pomc<sup>Ser</sup>) na morfologia e função da suprarrenal de camundongos, cujo gene Pomc foi condicionalmente silenciado com Tamoxifeno (Tmx). Foram obtidos animais machos adultos (Cre*Pomc<sup>floxflox</sup>*) 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<sup>floxflox</sup>* 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 Cre*Pomc*floxflox + 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 significante 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<sup>Cys</sup> e N-POMC<sup>Met</sup> apresentaram 1) aumento da corticosterona plasmática e apenas o N-POMC<sup>Cys</sup> aumentou o ACTH plasmático; 2) aumento de núcleos marcados para PCNA. Concluímos, que os camundongos Cre Pomcflox/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<sup>flox/flox</sup>.

#### **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 Proopiomelanocortina (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<sup>Cys</sup>, N-Pomc<sup>Met</sup> e N-Pomc<sup>Ser</sup>) on the morphology and function of the adrenal cortex of mice whose Pomc gene was conditionally silenced with Tamoxifen (Tmx). Adult males (CrePomcflox/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 *Pomcflox/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 CrePomcfloxflox + 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<sup>Cys</sup>, N-Pomc<sup>Met</sup> had 1) increase in plasma corticosterone and only N-POMCCys increased plasma ACTH; 2) increase of nuclei marked for PCNA. We conclude that Cre Pomc 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.

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Imagem ilustrativa da glândula suprarrenal localizada sobre os rins1	7
Figura 2 – Fotomicrografia representativa da glândula adrenal de rato1	9
Figura 3 - Esquema da composição do eixo HPA (Hipotálamo - Hipófise - Adrenal)2	20
Figura 4- Processamento da Pró-opiomelanocortina (POMC)	2
Figura 5- Esquema temporal para o silenciamento do gene Pomc	0
Figura 6 - Análise da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) 3	6
Figura 7- Análise do gasto energético (VO2) durante o dia, noite e 24 horas	7
Figura 8- Análise do coeficiente respiratório durante o dia, à noite e 24 horas3	7
Figura 9- Análise do consumo de água durante o dia, à noite e 24horas,	8
Figura 10 - Análise de a ingestão alimentar (A) e do peso basal (B)	;9
Figura 11- Fotomicrografia representativa das glândulas suprarrenais coradas com HE 4	·O
Figura 12- Análise da área do córtex (A) e do volume total (B)	. 1
Figura 13- Fotomicrografia representativa das glândulas suprarrenais dos animais4	-2
Figura 14- Quantificação das gotículas lipídicas coradas com Oil red O4	.3
Figura 15- Reação de imunohistoquímica para análise da expressão da proteína PCNA4	-4
Figura 16- Análise da concentração plasmática do ACTH nos animais CrePomc <sup>Flox/Fl</sup>	0)
tratados4	-5
Figura 17- Análise da concentração plasmática da corticosterona	-5
Figura 18- Fotomicrografia representativa das glândulas suprarrenais coradas com HE4	.7
Figura 19- Análise do volume total do córtex adrenal dos camundongos	8
Figura 20- Fotomicrografia representativa das glândulas suprarrenais	.9
Figura 21- Quantificação da coloração por Oil red O5	Ю
Figura 22- Reação de imunohistoquímica para análise da expressão da proteína PCNA5	; 1

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais	31
---------------------------------	----

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH Hormônio Adrenocorticotrófico

CRH Corticotropina

DEX Dexametasona

DHEA Dehidroepiandrosterona

HPA Hipotálamo-hipófise-suprarrenal

POMC Pró-opiomelanocortina

HE Hematoxilina e eosina

KO Knock-out

LPH Lipotropina

JP Joining Peptide

α-MSH Hormônio estimulador de melanócitos

β-endorfina Beta-endorfina

PCNA Proliferating Cell Nuclear Antigen

ORO Oil Red O

Pró-γ-MSH N-POMC 1-76

 $\text{N-POMC}^{\text{Met}} \qquad \quad \text{N-POMC}_{\text{1-28}}{}^{\text{Metiona}}$ 

N-POMC<sup>Cys</sup> N-POMC<sub>1-28</sub> Cysteine

N-POMC<sup>Ser</sup> N-POMC<sub>1-28</sub> Serina

TMX Tamoxifeno

BrdU Bromodeoxyuridine

#### Sumário

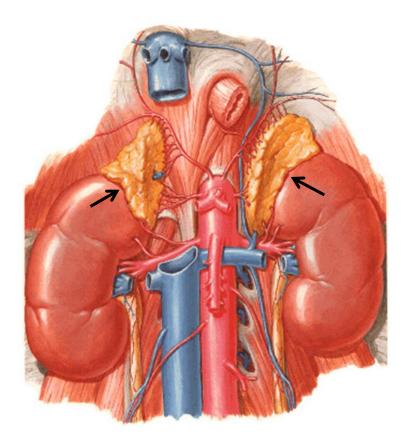
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Animais	28
3.2 Peptídeos utilizados	29
3.3 Silenciamento do gene <i>Pomc</i> através do sistema UBC-Cre/ERT2 ativado por	
Tamoxifeno (Tmx)	30
3.4 Quantificação do ACTH plasmático	31
3.5 Análise metabólica através do Oxymax/ Comprehensive Lab Animal Monitoring Syl	
3.6 Análise do peso corpóreo e ingestão alimentar	
3.7 Análises morfológicas e reconstrução anatômica da Glândula Adrenal	
3.8 Análise funcional através da coloração ORO – OIL RED O	33
3.9 Análises da expressão da proteína PCNA	33
3. 10 Análises estatísticas	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Caracterização dos animais utilizados	35
4.1.1 Análise do silenciamento da Pomc	35
4.1.2 Análise do gasto energético, coeficiente respiratório e consumo de água	36
4.1.3 Análise da ingestão de alimentos e peso corpóreo	38
4.1.4 Análise Morfológica	39
4.1.5 Análise funcional por coloração em Oil Red O	42
4.1.6 Análise da capacidade proliferativa	43
4.2 O tratamento com os peptídeos sintéticos N-terminal da POMC1-28	44
4.2.1 Análise do ACTH plasmático e da produção de corticosterona	44
4.2.2 Análise Morfológica	46
4.2.3 Análise funcional por coloração em Oil Red O	48
4.2.4 Análise da proteína PCNA por imunohistoquimica	50

5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÃO	57
RE	FERÊNCIAS*	58

#### 1 INTRODUÇÃO

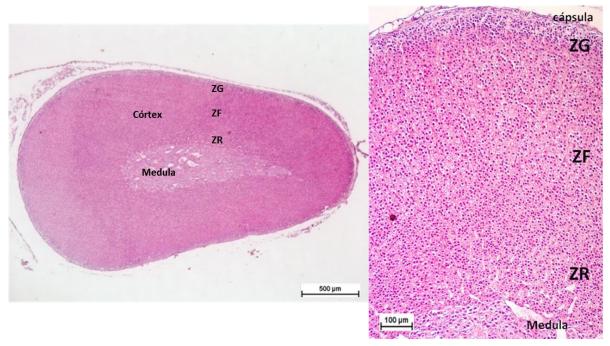
#### 1.1 A Glândula Suprarrenal

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.

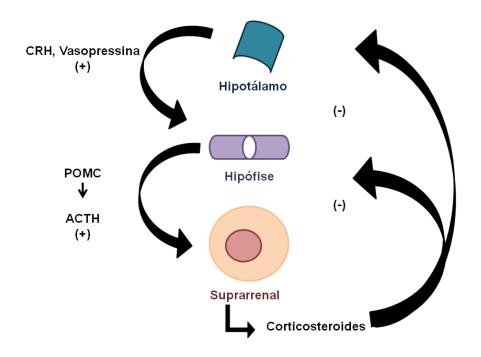
A zona Glomerulosa está localizada na região mais externa do córtex, e é a região adjacente à cápsula conjuntiva. Suas células com núcleo esférico único e citoplasma acidófilo formam aglomerados arredondados que são responsáveis pela produção e secreção de mineralocorticoides, como a aldosterona. A liberação 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 lipídeos concentração de é responsável pela síntese 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: HormFigura 3– Esquema da composição do eixo HPAônio 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.

#### Lobo Anterior da Hipófise 235 -26 Sequência N POMC 1-14 (pro-γ- MSH) β-LPH Joining **ACTH** Peptide Asp N POMC (1-52)β -Endorfina 1-31 MC2R Receptor Opiáceo Esteroidogênese Proliferação Controle da dor Adrenal Adrenal Lobo Intermediário da Hipófise -26 235 Sequência Sinal N POMC 1-14 (pro-γ- MSH) Joining ACTH β-LPH Peptide CLIP β Endorfina α-MSH γ-LPH N POMC 1-49 Lys - γ3 - MSH MC3R MC4R MC5R MC1R

**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.

Secreção

exocrina

Secreção

Regulação da ingesta

#### 1.5 O peptídeo NH<sub>2</sub>-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 hipofisectomisados (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<sup>Cys</sup> e com outro

com as cisteínas substituídas por metionina (1-28N-POMC<sup>Met</sup>), 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) (Figura 5) (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 consequentemente 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 hipofisectomisados 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 sobrevida 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 Pomo 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* flangueado por seguencias 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.

#### 2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos de diferentes peptídeos derivados do N-terminal da POMC na morfologia e função da suprarrenal de animais com o gene *Pomc* silenciado condicionalmente com tamoxifeno (TMX).

#### Objetivos específicos:

- Avaliar as alterações morfológicas induzidas pelo silenciamento do gene *Pomc* no córtex adrenal corados com HE, através da medida linear do córtex adrenal de animais Cre*Pomc*<sup>flox/flox</sup> tratados com TMX.
- Avaliar a capacidade de regeneração dos peptídeos N-terminal da Pomc sintéticos N-POMC 1-28 com e sem pontes dissulfeto, respectivamente, Cisteína (Cys), Metionina (Met) e Serina (Ser), e somente salina, no córtex adrenal de animais Cre Pomc<sup>flox/flox</sup> e controle, através da medida linear do córtex adrenal corados com HE.
- Analisar através da coloração ORO a função esteroidogênica e através da expressão da proteína PCNA a capacidade proliferativa por, respectivamente, histoquímica e imunohistoquímica.
- Quantificar o ACTH e a corticosterona no plasma sanguíneo para analisar, respectivamente, o silenciamento do gene *Pomc* e a função esteroidogênica, através de teste Elisa.
- Analisar a função metabólica por meio do peso corpóreo, ingestão alimentar e parâmetros através gaiola metabólica (CLAMS) de animais Cre Pomc<sup>flox/flox</sup> tratados com TMX e controle.

#### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Animais

Foram utilizados animais machos adultos (de aproximadamente 60 dias) obtidos do cruzamento de camundongos geneticamente modificados, portadores do gene Pomo flanqueado por seguências LoxP em homozigose desenvolvidos pela equipe do Dr. Bradford Lowell (Beth Israel Deaconess Medical Center - Harvard Medical School - Boston, MA EUA) e doados ao nosso laboratório, e de animais comerciais (Jackson Laboratories - Bar Harbour - ME EUA) da linhagem B6.Cg-Tg(UBC-Cre/ERT2)1Ejb/J, que possui a enzima Cre transcrita sob controle de um promotor do gene da ubiquitina C. Foram obtidos animais Cre Pomc<sup>flox/flox</sup>, que possuem a enzima Cre-recombinase e o gene da Pomc silenciado ativado por Tmx conforme e animais Pomcflox/flox. No animal Cre Pomcflox/flox ("knock-out" induzível) a região codificadora de Cre é fusionada com o domínio de ligação do receptor de estrógeno humano (ERT2). A proteína fusionada Cre é expressa em todos os tipos celulares por meio do promotor de ubiquitina C, entretanto, mantém-se inativa devido à interação com as proteínas "Heat Shock" (HSP90) que interferem com a atividade da recombinase. Cre-ERT2 torna-se ativo quando o ligante 4-OH-Tamoxifeno está presente e promove a dissociação das proteínas HSP90 do complexo. Após dissociação, a proteína Cre-ERT2 fusionada é liberada do complexo e promove a excisão do segmento de DNA entre o intron 2 e o exon 3, região codificadora do gene *Pomc* flanqueado por sítios LoxP. Foram utilizados pelo menos 4 animais para cada experimento. Os animais utilizados neste trabalho estão de acordo com código da aprovação do comitê de ética 091/13/CEUA.

#### 3.2 Peptídeos utilizados

Os animais foram tratados com peptídeos derivados do gene da *Pomc*, como os peptídeos sintéticos N-POMC<sub>1-28</sub><sup>Cys</sup> com a pontes dissulfeto nas Cisteínas (Cys) nas posições 2, 8, 20 e 24, e N-POMC<sub>1-28</sub><sup>met</sup> onde foram substituídas as Cisteínas por Metioninas. Além disso, as Cisteínas/Metioninas foram trocadas por Serina como controle.

N-POMC<sup>Cys</sup>: foi sintetizado a sequência de aminoácidos *H*-Trp-**Cys(2)**-Leu-Glu-Ser-Ser-Gln-**Cys(8)**-Gln-Asp-Leu-Thr-Thr-Glu-Ser-Asn-Leu-Leu-Ala-**Cys(20)**-Ile-Arg-Ala-**Cys(24)**-Arg-Leu-Asp-Leu-*OH*. Esse peptídeo contém pontes dissulfeto entre as Cisteínas 2-24 e 8-20 sintetizado pela Bachem America Inc, Torrance, CA, EUA.

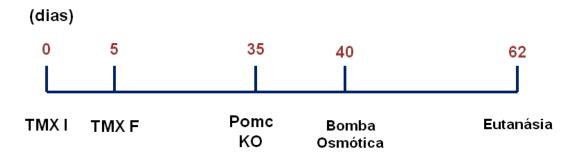
N-POMC<sup>Met</sup>: foi sintetizado a sequência de aminoácidos *H*-Trp-Met(2)-Leu-Glu-Ser-Ser-Gln-Met(8)-Gln-Asp-Leu-Thr-Thr-Glu-Ser-Asn-Leu-Leu-Ala- Met(20)-lle-Arg-Ala-Met(24)-Arg-Leu-Asp-Leu-*NH*<sub>2</sub>. Os resíduos de Cisteínas foram substituídos por Metioninas, impedindo a formação de pontes dissulfeto. A síntese foi realizada pela Professora Doutora Maria Aparecida Juliano no Laboratório do Departamento de Biofísica e Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo. Foi sugerida a substituição das Cisteínas por Metioninas, pois tecnicamente não seria trivial sintetizar os peptídeos de maneira correta com as pontes dissulfeto entre os resíduos de Cisteína. Essa substituição teve como finalidade evitar a formação de atípicos quanto as Cisteínas são mantidas sem as pontes dissulfeto.

N-POMC<sup>Ser</sup>: foi sintetizada a sequência de aminoácidos *H*-Trp- **Ser(2)**-Leu-Glu-Ser-Ser-Gln-**Ser(8)**-Gln-Asp-Leu-Thr-Thr-Glu-Ser-Asn-Leu-Leu-Ala-**Ser(20)**-Ile-Arg-Ala-**Ser(24)**-Arg-Leu-Asp-Leu-*OH*. Os peptídeos contendo as Serinas ao invés de Cisteínas foram sintetizados para impedir a formação das pontes dissulfeto (sintetizado pela Bachem America Inc, Torrance, CA, EUA).

## 3.3 Silenciamento do gene *Pomc* através do sistema UBC-Cre/ERT2 ativado por Tamoxifeno (Tmx)

O silenciamento do gene *Pomc* foi realizado por injeção intra-peritoneal de Tmx (T5648 Sigma- Aldrich) na concentração de 6 mg / 40 g de peso corpóreo durante 5 dias, segundo o protocolo indicado pela Jackson Laboratories\*. Após esse período os animais foram tratados por 21 dias com os peptídeos indicados no item acima, ou com o veículo de salina, com a utilização de minibombas osmóticas (modelo 2004, ALZET® Osmotic Pumps., Cupertino, CA, EUA) implantadas no tecido subcutâneo da região dorsal. As minibombas osmóticas utilizadas liberam um volume de 200 µl por no máximo de 4 semanas de infusão, e um fluxo de 0.25 ± 0.05 µl/hr. Após tratamento foi realizada a eutanásia por decapitação em guilhotina e as glândulas adrenais foram retiradas para análises histológicas, bem como o plasma sanguíneo para dosagem do ACTH e esteroides. O esquema experimental está apresentado na Figura 5, e a discriminação dos grupos experimentais e controle na Tabela 1.

\*(https://www.jax.org/mouse-search?searchTerm=cre+ert2+ubiquitina+C)



**Figura 5-** Esquema temporal para o silenciamento do gene Pomc. Tmx I (Tamoxifeno Inicial) e TMX F (Tamoxifeno Final). A aplicação do Tmx dura 5 dias. Pomc KO (silenciamento da Pomc pode ser observado com 35 dias).

Tabela 1 – Grupos experimentais

Genótipo	Grupos	Tratamentos
Pomc flox/flox	Controle*	Salina
Cre Pomc flox/flox	Salina	Salina
Cre Pomc flox/flox	N-POMC <sup>Cys</sup>	N-POMC <sup>cys</sup> <sub>1-28</sub>
Cre Pomc flox/flox	N-POMC <sup>Met</sup>	N-POMC <sup>met</sup> <sub>1-28</sub>
Cre Pomc flox/flox	N-POMC <sup>Ser</sup>	N-POMC <sup>ser</sup> <sub>1-28</sub>

<sup>\*</sup> sem adminstração de Tmx

#### 3.4 Quantificação do ACTH plasmático

Após a eutanásia dos animais o sangue coletado, aproximadamente 200 μl, foi armazenado em tubos de ensaio contendo EDTA. Após transferência para microtubos, o sangue foi centrifugado (10 min; 10000 rpm à 4° C), o sobrenadante (plasma) retirado e estocado a - 80°C. Para quantificação do ACTH plasmático, foram utilizadas placas de ELISA de ensaios Multiplex específicos para camundongo (ACTH; Cat #: MBNMAG-41K; Milliplex assay Multiplex; Merck/Millipore, Germany). Os ensaios foram realizados na forma de prestação de serviços pela Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas – LIMO3.

### 3.5 Análise metabólica através do Oxymax/ Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS)

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas chamada de CLAMS pertencentes ao laboratório do Prof. José Donato Junior do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBI). Foram analisados o consumo de O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>), a relação de troca respiratória e a ingestão de água detectada por sensores infravermelhos. Após 3 dias de adaptação dentro do CLAMS, os parâmetros metabólicos de cada animal foram

ajustados com relação ao peso de cada animal e avaliado. Os animais permaneceram nas gaiolas por 5 dias, portanto os resultados apresentados foram à média desse período. Foram avaliados no CLAMS 4 animais controle (*Pomc flox/flox*) e 4 animais silenciados com o tamoxifeno (Cre *Pomc flox/flox*).

#### 3.6 Análise do peso corpóreo e ingestão alimentar

A avaliação do consumo alimentar bem como do peso corpóreo foi realizada 3 vezes por semana. Iniciamos pesagem aproximadamente com 60 dias de vida até a eutanásia dos animais.

#### 3.7 Análises morfológicas e reconstrução anatômica da Glândula Adrenal

As análises morfológicas das glândulas suprarrenais foram realizadas através de cortes histológicos corados com Hematoxilina (1159380025- Merck., Darmstadt, Alemanha) e Eosina de Putt (1159350025- Merck., Darmstadt, Alemanha) (HE). As glândulas esquerdas foram retiradas e fixadas em paraformaldeído 4% por até 12h e após esse período foram lavadas com tampão PBSA mais sacarose 6%, para retirada do fixador, e mantidas "overnight" nessa solução. A desidratação foi realizada por concentrações crescentes de álcoois e em seguida as glândulas foram diafanizadas em xilol e seguida à inclusão em parafina. Foram realizados cortes histológicos seriados de 10 µm de espessura em micrótomo convencional e montados sobre lâminas gelatinizadas. Após processo de desparafinização a 60°C e reidratação em álcool e água, os cortes foram corados com HE e montados com lamínula e Entellan (Merck., Darmstadt, Alemanha). A morfologia das células e das zonas que compõem o córtex adrenal foi analisada em microscópio de luz com a ajuda de uma objetiva graduada de 1 mm e através do software de imagem Neurolucida e Neurolucida Explorer (MBF Bioscience., Williston, VT 05495 EUA). Foram feitas medidas da área do córtex e a medula adrenal. As medidas foram feitas através da marcação do

contorno da área total do córtex e da medula, a cada 5 secções, do início ao final da glândula adrenal que foram coradas com HE. Essas análises foram feitas às cegas, e os tratamentos e controles decodificados posteriormente. Os dados obtidos da medida da área total de cada glândula permitiram a reconstrução anatômica em 3D realizado pelo Software Neurolucida®, e o cálculo do volume total da glândula analisada pelo Neurolucida Explorer®.

#### 3.8 Análise funcional através da coloração ORO - OIL RED O

Após a eutanásia dos animais, a glândula direita foi recolhida e imediatamente congelada em gelo seco. Os tecidos foram armazenados a -80° C e os órgãos incorporados em O.C.T (Optimal Cutting Temperature- Tissue-Puls®., Fisher HealthCare, EUA) diretamente sobre o molde de criostato. Os cortes foram realizados em criostato a 7 μm de espessura e montado sobre lâminas silanizadas. Foi utilizado 1ml de Oil Red O (Sigma Aldrich– O0625-25G, MO, EUA) à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida o material lavado em água destilada, contra corado com hematoxilina e evidenciado em carbonato de lítio. As lâminas foram lavadas durante 12 min com água corrente e montadas com PBSA e glicerol 20%. As imagens foram quantificadas utilizando um Software Imagej® de acordo com o protocolo utilizado por MEHLEM et al., 2013.

#### 3.9 Análises da expressão da proteína PCNA

Após a eutanásia dos animais a glândula direita foi retirada e incluída em O.C.T (Optimal Cutting Temperature- Tissue-Puls®., Fisher HealthCare, EUA) e congeladas à -80°C. Foram realizados cortes histológicos a 7 μm de espessura em criostato na temperatura de -21°C e reações de imunofluorescência com o anticorpo para proteína PCNA (Abcam). Após resfriamento os cortes ficaram em temperatura ambiente "overnight" e foram armazenados a -80°C. Os cortes foram fixados com paraformoldeído 4% a temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBSA feito a recuperação

antigênica com Tampão de Cítrico em pH 6, em 2 banhos de 5 minutos no micro-ondas, e esfriou por 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com 50% de Álcool Metílico e 50% de Peroxido de Hidrogênio, em seguida as lâminas foram lavadas e levadas para uma cuba horizontal. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado utilizando 10% de soro de cavalo diluído em PBSA por 1 hora, seguido de lavagem com PBSA. Os cortes foram incubados overnight com o anticorpo primário diluído 1:50 ,Triton-100X a 1% e soro de cavalo 5%. As reacões de imunohistoquímica foram feitas com o anticorpo anti-PCNA (Abcam- Ab 2426). Após lavagem com tampão PBSA, as lâminas foram incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário Anti-rabbit (Kit Vector – PK- 6101) diluído 1:100, seguido de lavagens com PBSA. Para o complexo AB foi utilizado o mesmo Kit da Vector Anti-rabbit diluído 1:100. Em seguida relevado em DAB, contra-corado com Hematoxilina, o núcleo evidenciado com carbonato de lítio e depois foi passado pela bateria de montagem. Como controle da reação alguns cortes não foram incubados com o anticorpo primário. As análises foram realizadas em microscópio (Nikon® Eclipse 80i), utilizando um Software chamado de Microlucida® e os resultados apresentados em fotomicrografias representativas das reações.

#### 3. 10 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism® para análise de variância (ANOVA), ou Teste t quando cabível, para p< 0.05.

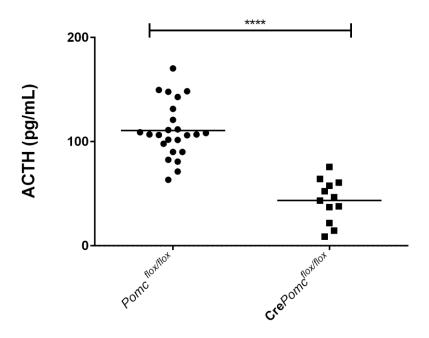
#### 4 RESULTADOS

#### 4.1 Caracterização dos animais utilizados

#### 4.1.1 Análise do silenciamento da Pomc

Resultados ainda não publicados da obtenção das linhagens de camundongos geneticamente modificados foram confirmados através da análise do DNA genômico por reação de PCR. Resultado ainda não publicado da caracterização desses animais foi realizada pela análise da hipófise quanto à expressão das proteínas *Pomc* e β-endorfina, um dos seus subprodutos, por reação de imunofluorescência, que apresentaram níveis reduzidos devido à administração do tamoxifeno (Tmx). No presente trabalho utilizamos a análise da concentração do ACTH plasmático nos animais obtidos para comprovar se houve o bloqueio do eixo HPA através do silenciamento do gene da *Pomc*, após administração do Tmx em animais Cre *Pomc*<sup>Flox/Flox</sup>, em relação aos animais controle, animais *Pomc*<sup>Flox/Flox</sup> (Figura 6).

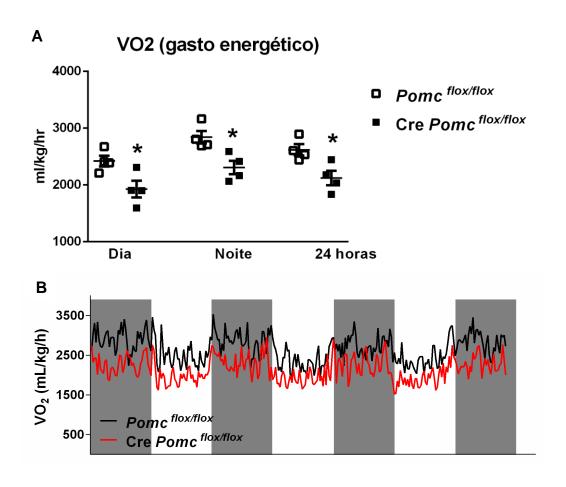
A administração de Tmx em animais Cre*Pomc* flox/flox (Cre*Pomc* flox/flox +Tmx), apresentou uma diminuição significante (p<0.0001) do ACTH plasmático em relação ao animal controle  $Pomc^{flox/flox}$ , o que mostra uma inibição parcial do eixo HPA. Em média os animais  $Pomc^{flox/flox}$  apresentaram 110.7 ± 26.0 pg/mL de ACTH plasmático enquanto os animais Cre $Pomc^{flox/flox}$ +Tmx 43.4 ± 19.6 pg/mL, portanto uma diminuição de 60,8%. A diminuição do ACTH no plasma sugere uma diminuição dos demais fatores do processamento da POMC, que inclui o peptídeo N-terminal da Pomc. As médias das concentrações do ACTH plasmático de ambos os tipos de camundongos foram consideradas para a inclusão dos animais nos resultados experimentais.



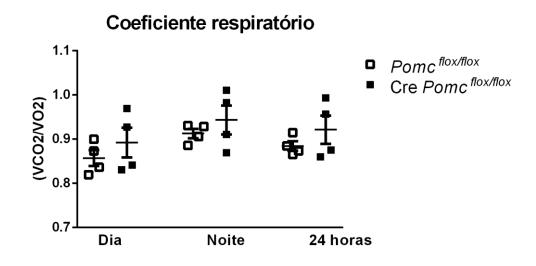
**Figura 6**- Análise da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no plasma dos animais Pomc<sup>Flox/Flox</sup> e os *Cre Pomc<sup>Flox/Flox</sup>* tratados com tamoxifeno (Tmx). Teste t de Student; \*\*\*\*p:<0.0001; N=24-12.

#### 4.1.2 Análise do gasto energético, coeficiente respiratório e consumo de água.

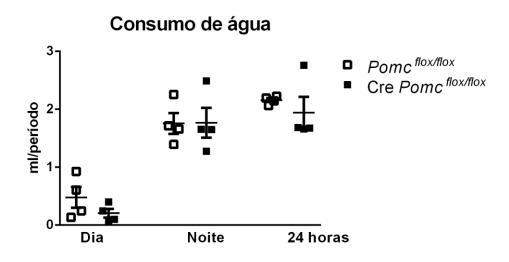
Como parte da caracterização dos animais foram realizadas avaliações do gasto energético, do coeficiente respiratório e do consumo de água dos camundongos Cre  $Pomc^{flox/flox}$  tratados com Tmx, em relação ao animal controle  $Pomc^{flox/flox}$ . Na figura 7A observamos uma redução significante (p=0.0222) do consumo de O<sub>2</sub> (VO2), portanto do gasto energético, no camundongo Cre  $Pomc^{flox/flox}$  durante o dia, à noite e depois de 24 horas. Além disso, a análise do gasto energético ao longo de 5 dias (Figura 7B), mostrou diferenças ao longo do tempo entre os camundongos Cre $Pomc^{flox/flox}$  (linha em vermelho), cujo eixo HPA foi inibido, e os camundongos controle  $Pomc^{flox/flox}$  (linha em cor preta). Em relação ao coeficiente respiratório, isto é, a relação entre VCO2/VO2 (Figura 8) e consumo de água (Figura 9), não houve diferenças significantes entre os animais analisados.



**Figura 7-** Análise do gasto energético (VO2) durante o dia, noite e 24 horas **(A)**, e no decorrer dos 5 dias **(B)**, dos animais controle (Pomc flox/flox) representados em preto e Cre *Pomc* flox/flox tratados com Tmx, representados em vermelho. N=4. \* p=0.0222



**Figura 8**- Análise do coeficiente respiratório durante o dia, à noite e 24 horas, dos animais Controle (*Pomc* flox/flox) e Cre *Pomc* flox/flox + Tmx. N=4.

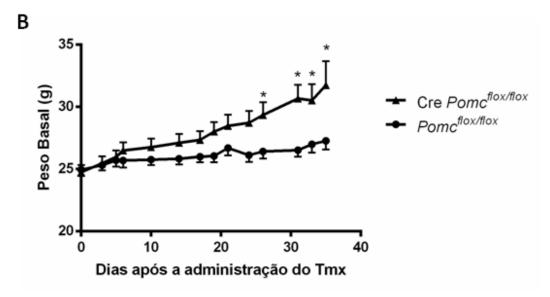


**Figura 9-** Análise do consumo de água durante o dia, à noite e 24horas, dos animais Controle (*Pomc* flox/flox) e Cre *Pomc* flox/flox.+ Tmx. N=4.

#### 4.1.3 Análise da ingestão de alimentos e peso corpóreo

A análise da ingestão de alimentos (Figura 10A) e do peso dos animais (Figura 10B) ao longo de 40 dias após a administração do Tmx nos camundongos Cre*Pomc* flox/flox mostrou um aumento significante (p<0.05) de ambos os parâmetros, em relação ao animal controle *Pomc* flox/flox. Após os 40 dias de inibição do eixo HPA houve um aumento de 114.3% na ingestão de alimentos e de 121.2% no peso dos animais Cre*Pomc* flox/flox em relação aos animais controle *Pomc* flox/flox.



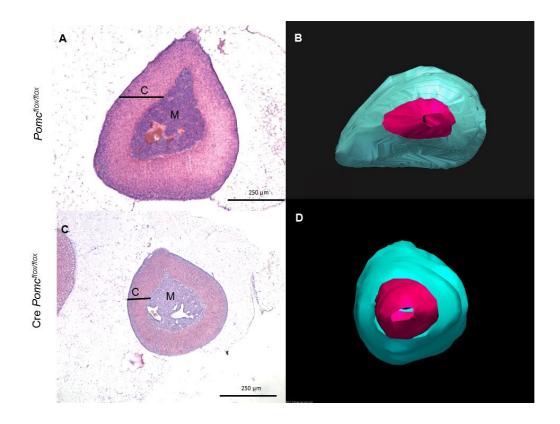


**Figura 10 -** Análise de a ingestão alimentar (A) e do peso basal (B) dos animais controle (Pomc flox/flox) e Cre *Pomc* flox/flox.+ Tmx. N=9-15.

#### 4.1.4- Análise Morfológica

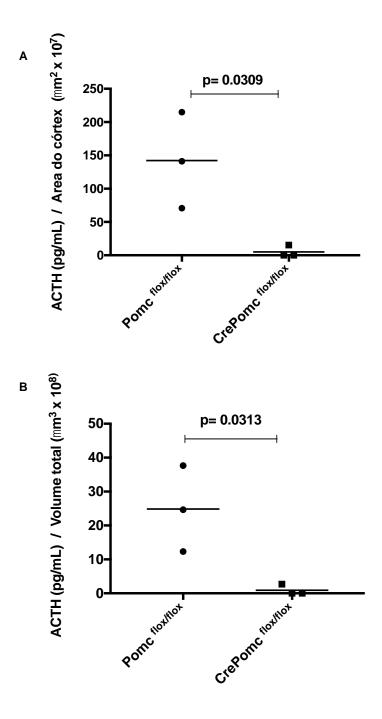
# Análise da morfologia da glândula suprarrenal e a reconstrução anatômica

Na figura 11 estão apresentadas as glândulas adrenais dos animais  $Pomc^{flox/flox}$  (A e B) e dos animais  $CrePomc^{flox/flox}$  +Tmx (C e D), quanto à morfologia e reconstrução anatômica. A análise microscópica mostrou que as glândulas dos animais  $CrePomc^{flox/flox}$ +Tmx (Figura 11C) apresentaram redução do tamanho, o que está menos evidente após a reconstrução anatômica (Figura 11D).



**Figura 11-** Fotomicrografia representativa das glândulas suprarrenais coradas com HE (A-B) e a reconstrução em 3D (B e D) respectivamente dos animais controle Pomc<sup>flox/flox</sup> (A e B) e dos Cre *Pomc<sup>flox/flox</sup>* + Tmx (C e D). M= Medula e C= Córtex.

A quantificação da área e do volume total das glândulas levou em conta somente aqueles camundongos *Pomc<sup>flox/flox</sup>* e Cre*Pomc<sup>floxflox</sup>* que apresentaram a concentração plasmática de ACTH dentro da média estabelecida anteriormente, 110.7 ± 26.0 pg/mL e 43.4 ± 19.6 pg/mL, respectivamente. Portanto, os resultados da quantificação da área córtex (μm²) e do volume total da glândula (μm³) foram relativos à concentração do ACTH plasmática dos animais analisados (Figura 12A e 12B). Esses resultados mostraram uma diminuição significativa da área (p=0.0309) e do volume (p=0.0313) da glândula, em concordância com a análise morfológica (Figura 11).

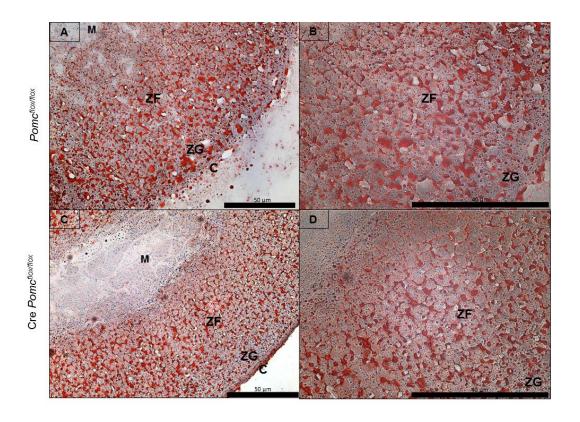


**Figura 12-** Análise da área do córtex (A) e do volume total (B) da glândula adrenal nos animais: controle  $(Pomc^{flox/flox})$  e os animais Cre  $Pomc^{flox/flox}$ + Tmx. (teste t de Student), N=3

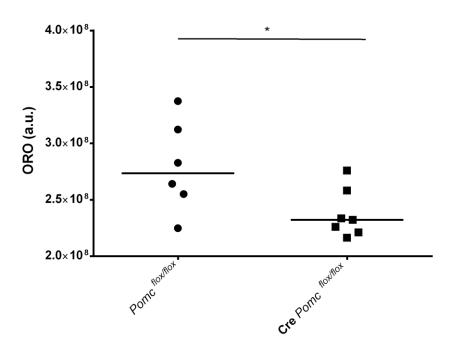
.

# 4.1.5 Análise funcional por coloração em Oil Red O

O estado funcional da glândula adrenal foi avaliado pela intensidade e distribuição da coloração em vermelho das gotículas lipídicas no córtex adrenal. Conforme esperado a medula não apresentou coloração, enquanto que no córtex adrenal observou-se uma distribuição uniforme ao longo de todo o córtex adrenal dos animais  $Pomc^{flox/flox}$  (Figura 13 A-B) em comparação ao camundongo Cre  $Pomc^{flox/flox}$ +Tmx (Figura 13 C-D). A quantificação da coloração do Oil Red através do sistema ImageJ (Figura 14) mostrou uma redução significante (p=0.0372) da coloração nos camundongos  $Pomc^{flox/flox}$ +Tmx, o que sugere uma diminuição da capacidade de produção/secreção dos esteroides nesses animais, em comparação com o controle, animais  $Pomc^{flox/flox}$ .



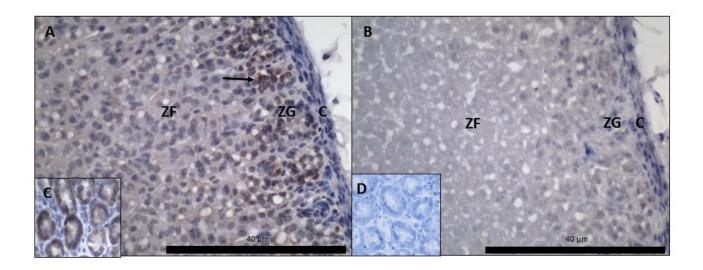
**Figura 13-** Fotomicrografia representativa das glândulas suprarrenais dos animais **(A-B)**  $Pomc^{Flox/Flox}$  (Controle) e os Cre  $Pomc^{Flox/Flox}$  + Tmx, **(C-D)**, observamos a marcação de gotículas lipídicas por Oil Red (ORO). M= Medula; ZF= Zona Fasciculada; ZG= Zona Glomerulosa; C= Cápsula.



**Figura 14-** Quantificação das gotículas lipídicas coradas com Oil red O na adrenal nos animais Pomc<sup>Flox/Flox</sup> (Controle) e os Cre Pomc<sup>Flox/Flox</sup> + Tmx. \* p=0.0372 (teste t de Student). N=6-7.

#### 4.1.6 Análise da capacidade proliferativa

Para determinar se há alteração da capacidade proliferativa do córtex adrenal em animais Cre *Pomc* floxflox + Tmx analisamos a proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) por imunohistoquímica (Figura 15). O córtex adrenal de camundongos *Pomc* floxflox (Figura 15 A) apresentou um número maior de núcleos marcados concentrado nas células da subcápsula e na zona glomerulosa, do que os camundongos Cre *Pomc* floxflox + Tmx (Figura 15 B). Como controle positivo, utilizamos cortes de intestino, que está apresentado no inserto C da Figura 15 A, enquanto o inserto D na Figura 15 B representa o controle negativo da reação para PCNA de corte de intestino. Esses resultados mostraram que após silenciamento do gene da *Pomc* o córtex adrenal apresentou uma redução das células em proliferação.

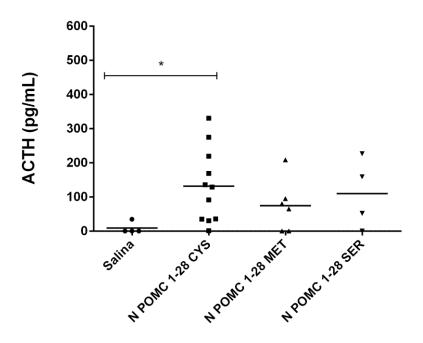


**Figura 15-** Reação de imunohistoquímica para análise da expressão da proteína PCNA no córtex da suprarrenal de camundongos **(A)** Pomc<sup>Flox/Flox</sup> e **(B)** Cre Pomc<sup>Flox/Flox</sup> + Tmx. **(C)** Inserto de corte de intestino (controle positivo) e **(D)** inserto de corte de intestino sem o anticorpo primário (controle negativo). ZF= Zona Fasciculada; ZG= Zona Glomerulosa; C= Cápsula.

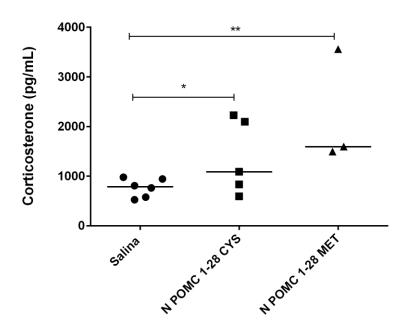
# 4.2 O tratamento com os peptídeos sintéticos N-terminal da POMC1-28

#### 4.2.1 Análise do ACTH plasmático e da produção de corticosterona

A Figura 16 mostra os resultados da análise da concentração do ACTH plasmático dos animais CrePomc+Tmx após tratamentos com os diferentes peptídeos N-terminal da Pomc (N-Pomc Cys, Met e Ser), enquanto a Figura 17 mostra a produção da corticosterona após esses tratamentos. Em comparação com o animal tratado somente com salina observamos um aumento significante (p< 0.05) da concentração do ACTH somente nos camundongos tratados com o peptídeo peptídeos N-Pomc<sup>Cys</sup>, apesar da grande variação observada entre os animais (Figura 16). Com relação à produção de corticosterona, ambos os peptídeos N-Pomc<sup>Cys</sup> e N-Pomc<sup>Met</sup> aumentaram de maneira significante, respectivamente, p= 0.043 e p= 0.0076, a produção da corticosterona plasmática (Figura 17). Não foram realizados experimentos com o peptídeo N-Pomc<sup>Ser</sup>.



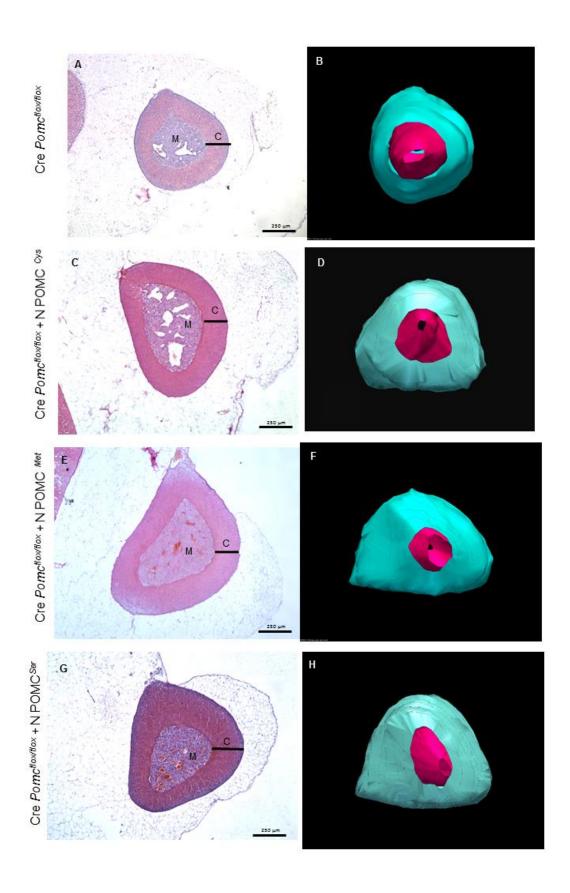
**Figura 16-** Análise da concentração plasmática do ACTH nos animais CrePomc<sup>Flox/Flox</sup> tratados com salina e com os peptídeos, N-POMC<sup>cys</sup>, N-POMC<sup>Met</sup> e N-POMC<sup>Ser</sup>. Teste ANOVA (\*p<0,05). N= 4-10.



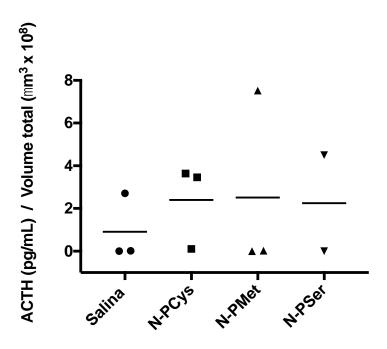
**Figura 17-** Análise da concentração plasmática da corticosterona nos animais CrePomc<sup>Flox/Flox</sup> tratados com salina e com os peptídeos, N-POMC<sup>cys</sup>, N-POMC<sup>Met</sup> e N-POMC<sup>Ser</sup>. \* p= 0.043 e \*\* p= 0.0076. N=6-3.

# 4.2.2 Análise Morfológica

A análise dos cortes histológicos corados com HE (Figura 18 A, C, E e G), a reconstrução anatômica (Figura 18 B, D, F e H) e a quantificação do volume total das glândulas adrenais (Figura 19) em camundongos Cre*Pomc*<sup>flox/flox</sup> tratados com salina (Figura 18 A-B) e camundongos Cre*Pomc*<sup>flox/flox</sup> tratados com os peptídeos sintéticos 1-28 N-POMC<sup>Cys</sup> (N-PCys, Figura 18 C-D), N-POMC<sup>Met</sup> (N-PMet, Figura 18 E-F) e N-POMC<sup>Ser</sup> (N-PSer, Figura 18 G-H) mostrou um aumento do tamanho das adrenais após tratamento. No entanto, a quantificação do volume total não foi significante para nenhum dos tratamentos utilizados quando comparados com os camundongos tratados com salina.



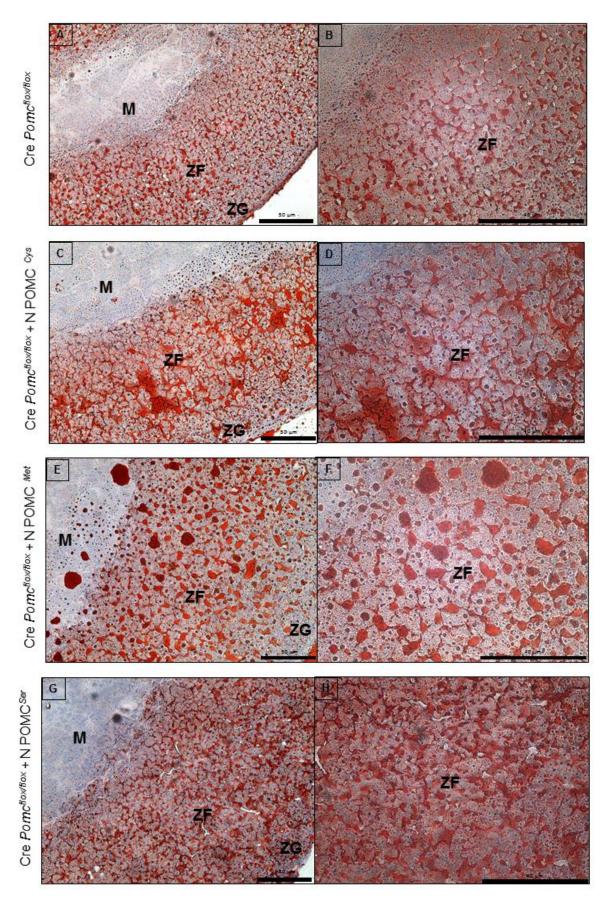
**Figura 18**- Fotomicrografia representativa das glândulas suprarrenais coradas com HE e a reconstrução em 3D respectivamente dos animais Cre Pomc<sup>flox/flox</sup> tratados com salina **(A-B)**, e tratados com os peptídeos sintéticos 1-28 N POMC<sup>cys</sup> **(C-D)**, N-POMC<sup>Met</sup> **(E-F)** e N-POMC<sup>Ser</sup> **(G-H)**. M= Medula e C= Córtex.



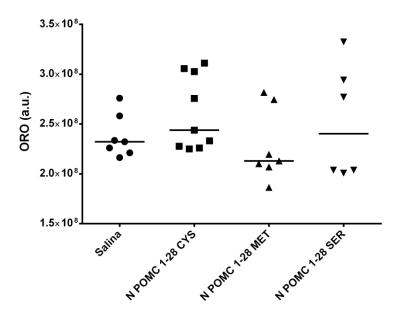
**Figura 19-** Análise do volume total do córtex adrenal dos camundongos Cre*Pomc*<sup>flox/flox</sup> tratados com salina (Salina) e tratados com N-POMC<sup>Cys</sup> (N-PCys), N-POMC<sup>Met</sup> (N-PMet) e N-POMC<sup>Ser</sup> (N-PSer). N=3-2.

# 4.2.3 Análise funcional por coloração em Oil Red O

A análise das glândulas dos animais tratados com os peptídeos N POMC<sup>Cys</sup> (Figura 20 C-D), N-POMC<sup>Met</sup> (Figura 20 E-F) e N-POMC<sup>Ser</sup> (Figura 20 G-H) não apresentou alteração na redistribuição nem na quantidade de gotículas lipídicas em relação às glândulas dos animais Cre*Pomc* flox/flox tratados com salina (Figura 20 A-B). De fato, a quantificação do *Oil Red* utilizando o sistema *ImageJ* (Figura 21) confirmou que não houve diferenças significantes entre os grupos analisados.



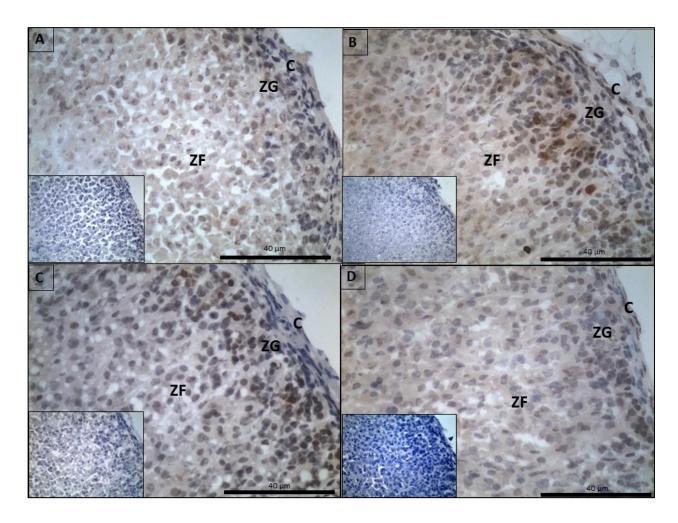
**Figura 20-** Fotomicrografia representativa das glândulas suprarrenais dos animais **(A-B)** Cre  $Pomc^{Flox/Flox}$  tratados com salina e com os peptídeos, N POMC<sup>1-28 cys</sup> **(C-D)**, N-POMC<sup>1-28Met</sup> **(E-F)** e N-POMC<sup>1-28Ser</sup> **(G-H)**, a coloração das gotículas lipídicas por *Oil Red* (ORO). M= Medula; ZF= Zona Fasciculada e ZG= Zona Glomerulosa.



**Figura 21**- Quantificação da coloração por Oil red O (ORO) das gotículas lipídicas no córtex adrenal nos animais Cre  $Pomc^{Flox/Flox}$  tratados com salina e tradados com os peptídeos, N POMC<sup>1-28 cys</sup>, N-POMC<sup>1-28Met</sup> e N-POMC<sup>1-28Ser</sup>. N = 9-6

#### 4.2.4 Análise da proteína PCNA por imunohistoquimica

A avaliação da capacidade proliferativa do córtex adrenal, através da análise por imunohistoquímica da proteína PCNA, dos animais Cre*Pomc*floxflox+Tmx tratados com os peptídeos (Figura 22) mostrou que os peptídeos de N-POMC<sup>cys</sup> (Figura 22 B), N-POMC<sup>Met</sup> (Figura 22 C) induziram um aumento de núcleos PCNA-positivos em relação aos animais tratados somente com salina (Figura 22 A) e animais tradados com o peptídeo N-POMC<sup>Ser</sup> (Figura 22 D). A marcação positiva para a proteína PCNA foi observada concentrada nas células da subcápsula e na zona glomerulosa. Esses resultados sugerem que os peptídeos N-POMC<sup>Cys</sup> e N-POMC<sup>Met</sup> podem estimular a proliferação do córtex adrenal.



**Figura 22-** Reação de imunohistoquímica para análise da expressão da proteína PCNA no córtex da suprarrenal de camundongos **(A)** Cre  $Pomc^{Flox/Flox}$  tratados com salina e com os peptídeos N-POMC<sup>cys</sup> **(B)**, N-POMC<sup>Met</sup> **(C)** e N-POMC<sup>Ser</sup> **(D)**. Os insertos são os respectivos controles negativos da reação. ZF= Zona Fasciculada; ZG= Zona Glomerulosa e C= Cápsula.

# 5 DISCUSSÃO

Nesse estudo apresentamos o modelo animal Cre Pomc flox/flox silenciado com o Tamoxifeno para o gene Pomc de maneira induzível. Esses animais são diferente de outros modelos descritos na literatura que utilizaram animais knockout para o gene Pomc (KRUDE et al., 1998; YASWEN et al., 1999; CHALLIS et al., 2004; COLL et al., 2006). Os animais knockout apresentaram importantes alterações como insuficiência adrenal severa, além de que a maioria desses animais morre ao nascer, o que tornou o modelo inviável para estudo. O modelo animal Cre Pomc flox/flox tem vantagens por não apresentar as mesmas limitações e por ser induzível ao silenciamento do gene Pomc em diferentes fases do desenvolvimento, como na fase adulta, que apresenta as glândulas adrenais formadas o que permite análises funcionais e metabólicas.

A proopiomelanocortina (POMC) desempenha um papel essencial na função metabólica. Conforme descrito por Yaswen e colaboradores (1999), o silenciamento do gene *Pomc* em camundongos causa disfunções como obesidade, sugerindo que as vias POMC endógenas são essenciais para a regulação do equilíbrio energético. A POMC após processamento resulta em peptídeos menores, dentre eles o ACTH. O ACTH uma vez clivado no lobo intermediário da hipófise resulta no α-MSH (hormônio estimulante de melanócito do tipo alfa) que está envolvido diretamente com a regulação da ingestão de alimentos. Nossos resultados da caracterização dos animais Cre*Pomc*<sup>flox/flox</sup> silenciado com o Tamoxifeno mostraram redução das concentrações do ACTH plasmático. Esses resultados sugerem que o silencimento do gene da *Pomc*, foi eficiente para diminuir o ACTH plasmático nesses animais (Cre*Pomc*<sup>flox/flox</sup>) e consequentemente dos demais peptídeos do processamento da Pomc. Estudos com o modelo animal POMC-null (YASWEN *et al.*, 1999), mostrou uma redução total da concentração do ACTH plasmático, enquanto que diferente do nosso modelo (Cre *Pomc*<sup>flox/flox</sup>) apresentou uma redução de aproximadamente 60%. No entanto, essa diminuição permitiu o estudo desses animais por um período de tempo maior,

pois a redução total da concentração do ACTH plasmático resulta em insuficiência adrenal e baixa taxa de natalidade, como foi descrito anteriormente.

Observamos nos animais Cre *Pomc*<sup>flox/flox</sup> alterações metabólicas, como aumento do peso corpóreo, da ingestão de alimentos, além da redução do gasto energético. Animais *knockout Pomc* tecido-específico mostraram obesidade associada à hiperfagia, diminuição da taxa metabólica e ausência de glicocorticóides circulante (SMART *et al.*, 2006). Outro estudo confirmou os efeitos da deficiência da POMC com animais apresentando aumento do peso corporal e da massa gorda, além disso, redução da taxa metabólica que contribuiu para um fenótipo obeso em animais *knockout* para a *Pomc* (CHALLIS *et al.*, 2004). Portanto, uma interrupção na função POMC na hipófise poderia ter um impacto secundário no balanço energético através de níveis hormonais reduzidos de glicocorticoides, que por sua vez regulam o metabolismo, distribuição de gordura, e o desenvolvimento da obesidade (DALLMAN *et al.*, 2003).

Ainda no nosso modelo, o silenciamento do gene da *Pomc* promoveu uma redução da área do córtex adrenal e do volume total da glândula dos animais Cre *Pomc* flox/flox. Esses resultados corroboram os dados obtidos utilizando os animais *Pomc knockout*, animais hipofisectomizados e animais cuja dexametasona foi administrada para inibição do eixo HPA (COLL *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2011).

A análise do estado funcional da glândula suprrarenal através da coloração com *Oil Red* mostrou uma redução significante das gotículas lipídicas e uma diferença na sua distribuição no córtex adrenal de animais Cre *Pomcflox/flox*. Devido a redução do ACTH plasmático, esse era uma resultado esperado, uma vez que o ACTH é o principal hormônio regulador da esteroidogenese adrenocortical (PEDERSEN; BROWNIE, 1980; SCHIMMER, 1980).

A proliferação celular no córtex adrenal ocorre para manutenção e ou renovação das células e como resposta a vários e específicos estímulos fisiológicos (WOOD et al., 2013).

Apesar de anteriormente existirem diversas teorias sobre como ocorre a renovação celular e a morte das células que compõem o córtex adrenal, atualmente a hipótese mais aceita é que as células menos diferenciadas estão localizadas tanto na cápsula quanto na região subcapsular e até mesmo entre as células que compõem a zona Gomerulosa no córtex da glândula (MORLEY et al., 1996; WOOD; HAMMER, 2011). As análises realizadas utilizando o marcador de proliferação, a proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), mostraram uma redução de núcleos positivos para PCNA na Zona Glomerulosa e subcapsular no córtex adrenal nos animais Cre*Pomc*floxflox. É necessário o equilíbrio adequado da proliferação e diferenciação de células progenitoras, e alterações nos mecanismos que regulam a diferenciação, a proliferação e a renovação das células progenitoras pode resultar em insuficiência adrenal (LERARIO et al., 2017). Nossos resultados indicam que houve uma diminuição de células em proliferação no córtex dos animais (Cre*Pomc*<sup>flox/flox</sup>) silenciados para o gene da *Pomc*, possivelmente devido à falta de estímulos e manutenção da glândula através do ACTH e N-POMCs. Estudos do nosso grupo mostraram que animais hipofisectomizados tratados com bromodioxiuridina (BrdU) apresentaram uma redução significante dos núcleos positivos para BrdU em concordância com nossos resultados (TORRES et al., 2007). A homeostase do córtex adrenal é responsável pela manutenção das diferentes zonas do córtex adrenal que ocorre através do equilíbrio entre proliferação e diferenciação celular centrípeta e contínua das células troncos/progenitoras que residem principalmente na zona glomerulosa e na região subcapsular (XING et al., 2015). Em resumo, os dados sugerem que a diminuição dos peptídeos derivados da POMC resulta na perda da homeostase do córtex adrenal, principalmente nas zonas mais externas do córtex adrenal.

O tratamento dos animais silenciados para a *Pomc* com o peptídeo 1-28 N-POMC<sup>Cys</sup>, cujas características foram descritas anteriormente, induziu, o aumento do ACTH plasmático. Esses resultados sugerem que o peptídeo N-POMC<sup>Cys</sup> foi capaz de estimular a

produção do ACTH pela adenohipófise ou a produção de CRH pelos núcleos hipotalâmicos, por mecanismos ainda não descritos. Por outro lado, tanto o peptídeo 1-28 N-POMC<sup>Cys</sup> quanto o peptídeo 1-28N-POMC<sup>Met</sup> induziram a produção de corticosterona pelas glândulas dos animais Cre*Pomc<sup>flox/flox</sup>* sugerindo uma ação desses peptídeos na esteroidogênese adrenal. Estudos *in vitro* mostraram que os dois peptídeos, 1-80 N-POMC e 1-76 N-POMC, apresentaram aumento da esteroidegênese de células em cultura primária de adrenal de ratos (CATHIARD *et al.*, 1985; AL-DUJAILI *et al.*, 1981). Outras evidências mostram que diferentes fragmentos dos peptídeos N-POMC, apesar de apresentarem uma ação esteroidogênica fraca, podem modular a ação esteroidogênica do ACTH (ESTIVARIZ *et al.*, 1982; LOWRY., 1983, 1984; FASSNACHT *et al.*, 2003). Outro estudo mostrou que além do ACTH, o peptídeo 1-77 N-POMC pode desempenhar um papel na esteroidogênese adrenal e no crescimento de adrenais antes do nascimento (ROSS *et al.*, 2000). Entretanto a análise funcional por análise da concentração e distribuição das gotículas lipídicas por *Oil Red* não apresentou diferenças após tratamentos com os peptídeos utilizados.

O peptídeo 1-28 N-POMC<sup>Cys</sup> com as de pontes dissulfeto entre as cisteínas Cys-2-Cys-24 e Cys-8-Cys-20 além de estimular a esteroidogênese foi suficiente para aumentar a capacidade proliferativa do córtex adrenal. No entanto, o peptídeo 1-28 N-POMC<sup>Met</sup>, cujas cisteínas foram substituídas pelas metioninas como uma estratégia para prevenir as pontes dissulfeto, de forma não esperada apresentou atividade biológica. Esses resultados estão de acordo com o observado em resultados anteriores utilizando animais tratados com dexametasona e incorporação de BrdU e tratamentos com os peptídeos N-POMC<sup>Cys</sup> e N-POMC<sup>Met</sup> (MENDONÇA *et al.*, 2011). No conjunto, esses resultados questionam sobre a conformação do peptídeo N-POMC endógeno e a necessidade das pontes dissulfeto.

Os resultados da análise da ação dos peptídeos N POMC<sup>Cys</sup>, N-POMC<sup>Met</sup> e N-POMC<sup>Ser</sup> na morfologia do córtex adrenal na reconstrução em 3D não apresentaram alterações significantes. Esses resultados estão de acordo com COLL (2006) cuja

administração do peptídeo 1-28 N-POMC não apresentou mudanças morfológicas macroscópicas na adrenal. No entanto, LOWRY *et al.*, (1983) observou que o peptídeo 1-28 N-POMC tem capacidade mitogênica no córtex adrenal *in vivo*, bem como outros resultados do nosso grupo (TORRES *et al.*, 2010; MENDONÇA *et al.*, 2011). Além disso, resultados *in vitro* mostraram que o tratamento com 1-28 N-POMC promoveu a ativação de ERK1/ 2 em culturas primárias de células adrenocorticais de ratos (MATTOS *et al.*, 2011). Portanto, os resultados apresentados sugerem que os peptídeos N POMC<sup>1-28 Cys</sup> e N-POMC<sup>1-28 Met</sup> tem ação proliferativa no córtex adrenal que estão de acordo com estudos anteriores.

# 6 CONCLUSÃO

- Os camundongos Cre Pomc<sup>flox/flox</sup> 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 peptideos N-POMC<sup>Cys</sup> e de N POMC<sup>Met</sup> mostrou que ambos regularam a função esteroidogênica da adrenal, enquanto o peptídeo N-POMC<sup>Cys</sup> estimulou a produção de ACTH, por mecanismos ainda não descritos.
- Os peptídeos N-POMC<sup>Cys</sup> e N POMC<sup>Met</sup> 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. Jl. 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 proopiomelanocortin 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 proopiocortin 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 adrenocorticotropic 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. **Narute**, 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 adrenocorticotropic 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 17α-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 nuclotide 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.