BÁRBARA BRITO DA CONCEIÇÃO

Estudo da expressão das enzimas esteroidogênicas e dos receptores aberrantes ectópicos na hiperplasia macronodular adrenal primária de pacientes com e sem mutação no gene *ARMC5*

> Dissertação apresentada ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

> > São Paulo 2018

Universidade de São Paulo Instituto de Ciências Biomédicas Departamento de Ciências Morfofuncionais

BÁRBARA BRITO DA CONCEIÇÃO

Estudo da expressão das enzimas esteroidogênicas e dos receptores aberrantes ectópicos na hiperplasia macronodular adrenal primária de pacientes com e sem mutação no gene *ARMC5*

> 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: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

> > São Paulo

2018

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)

Conceição, Bárbara Brito Estudo da expressão das enzimas esteroidogênicas e dos receptores aberrantes ectópicos na hiperplasia macronodular adrenal primária de pacientes com e sem mutação no gene ARMC5 / Bárbara Brito Conceição; orientadora Claudimara Pacicco Ferni Lotfi. -- São Paulo, 2018. 61 p. Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. ARMC5. 2. Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária. 3. Glândula Adrenal. 4. Enzimas Esteroidogênicas. 5. Receptores ectópicos . I. Lotfi, Claudimara Pacicco Ferni , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bárbara Brito da Conceição

Título da Dissertação: Estudo da expressão das enzimas esteroidogênicas e dos receptores aberrantes ectópicos na hiperplasia macronodular adrenal primária de pacientes com e sem mutação no gene ARMC5

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Claud	imara Fe	erini	Pacicco	Lotfi
A Comissão Julgadora dos trabalho	os de Defesa da Di	ssertaçã	ão, de Mestrado	
realizada a	/		/	, considerou
o(a) candidato(a):	() Aprovado(a) () Reprovado(a)	
Examinado(a): Assinatura:				
Nome:				
Instuição:				
Examinado(a): Assinatura:				
Nome:				
Instuição:				
Examinado(a): Assinatura:				
Nome:				
Instuição:				
Presidente : Assinatura:				
Nome:				
Instuição:				



Golaste Universitaria "Armando de Sales Olivera", Busanta Gão Paulo, SP - An Professor Lineu Presides, 3415 - 108 la - 05531 000
 Conneste de Elica em Presidea - Telefonia (11) 2001-1772 - e met regilipido taplar

São Paulo, 19 de maio de 2017.

PARECER 1339/CEPSH CAAE nº 08611013.3.3001.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, APROVOU no projeto intitulado: "Análise da expressão do transportador de glicose GLUT1 e HEXOKINASE II em suprarrenais de pacientes com hiperplasia adrenocortical macronodular independente de ACTH", da pesquisadora Profa. Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso, a inclusão da aluna de Mestrado, do Programa de Ciências Morfofuncionais do ICB, Bárbara Brito da Conceição.

Cabe às pesquisadoras elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria do CEP em 19/05/2018, bem como anexado uma cópia à Piataforma Brasil.

Atenciosamente,

Profa. Dra. CAMILA SOUARZONI DALE Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

NUS Manua -

Comité de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

Aos meus pais, Carlos e Vera Ás minhas irmãs, Julia e Nathalia.

Agradecimentos

Aos meus pais e irmãs, por todo apoio, compreensão e paciência. E por andarem a segunda milha por mim.

À minha orientadora, Dra. Claudimara Lotfi, pela oportunidade e orientação.

À Dra. Maria Candida Fragoso, do LIM-42 da Faculdade de Medicina-USP, pelo auxilio para obter as amostras e dados dos pacientes.

Aos funcionários e alunos do LIM-42, pelo auxilio nos momentos que precisei utilizar o laboratório.

Ao Dr. Fábio Daumas Nunes, pelo uso do microscópio de microdissecção, e aos técnicos, Edna e Juvani, pelo auxilio e disposição em me ajudar.

Aos antigos alunos do laboratório, pelos ensinamentos durante meu treinamento.

Aos amigos do laboratório e da vida, Jean (Coração), Thaís (Miss), Bárbara (Fofuxa/Papa), Isadora (Isa), Ismael (Ismaelzinho), Jéssica, Josi, Lívia, Eduarda (Duda) e Thabata por estarem sempre presentes, tornando os momentos difíceis mais leves, e essa jornada mais divertida.

À CAPES, CNPq e Fapesp pelo investimento financeiro.

Aos pacientes e familiares, por cederem amostras tão valiosas para o avanço dos estudos da hiperplasia adrenal.

Resumo

BRITO, BC. Estudo da expressão das enzimas esteroidogênicas e dos receptores aberrantes ectópicos na hiperplasia macronodular adrenal primária de pacientes com e sem mutação no gene ARMC5. 2018. 61 f.

A hiperplasia adrenocortical macronodular primária (PMAH) é uma causa rara de Síndrome de Cushing (SC). Apresenta como características macronódulos funcionantes em ambas as glândulas suprarrenais e uma produção variável de cortisol. Os nódulos apresentam uma produção ectópica de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) tornando a doença independente do ACTH hipofisário. Estudos independentes mostraram que mutações germinativas no gene armadillo repeat cointaining 5 (ARMC5) são uma causa frequente de PMAH. Além dessa mutação parece haver a participação de receptores hormonais ectópicos no córtex suprarrenal, que estimulariam a esteroidogênese e a hiperplasia da glândula. No entanto, os estudos sobre a relação entre o ARMC5 e a participação dos receptores aberrantes na produção de cortisol são incipientes. Portanto, temos como hipótese que as alterações no gene ARMC5 podem estar envolvidas no padrão celular e funcional das células que compõem os nódulos hiperplásicos na PMAH. Desta forma, nossos objetivos foram analisar: 1) a proporção de células espongiformes e compactas em cortes corados com hematoxilina e eosina; 2) a expressão gênica, nas células espongiformes e proteica de ambas as células, do ARMC5, das enzimas esteroidogênicas StAR ,3BHSD2 e CYP17A1, dos receptores da vasopressina (AVP1AR), serotonina (5HT4R) e do peptídeo inibidor gástrico (GIPR) e do ACTH ectópico e 3) a expressão do antígeno de proliferação celular, a proteína PCNA, para análise do padrão de proliferação em cortes histológicos de nódulos de hiperplasias de pacientes que apresentam mutações germinativas, mutações germinativas e somáticas ou não mutação no gene ARMC5. Os resultados mostraram que os nódulos hiperplásicos são compostos, na sua maioria, por células espongiformes, cujo padrão foi independente da presença de mutação. A expressão do ARMC5 nas células espongiformes foi maior em pacientes com mutação, e os receptores ectópicos apresentaram uma expressão maior no tecido de PMAH em relação à adrenal normal. A reação de imunoistoquimica revelou células positivas para a proteína ARMC5 e StAR, em ambos os tipos celulares, enguanto a enzima 3\BetaHSD2 foi predominante nas células espongiformes e a enzima CYP17A1 nas células compactas. A expressão de AVP1AR, 5HT4R, e do ACTH ectópico foi positiva em ambos os tipos celulares e independente da presença ou não da mutação no gene ARMC5, bem como a expressão da proteína PCNA. Portanto, nossos resultados sugerem que a presença ou não de mutações no gene ARMC5 nas hiperplasias não está envolvida no padrão celular das células que compõem os nódulos. O mesmo para a presença dos receptores AVP1AR, 5HT4R e GIPR, do ACTH ectópico e da proteína PCNA. Como conclusão, os resultados dos parâmetros analisados sugerem que as alterações no gene ARMC5 não estão envolvidas no padrão celular e funcional das células que compõem os nódulos hiperplásicos na PMAH, e podem ter o mesmo grau de importância na formação desses nódulos. Palavras-chaves: ARMC5, Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária, Enzimas

Esterodogênicas, Receptores Ectópicos.

Abstract

BRITO, BC. Study of the expression steroidogenic enzymes and ectopic receptors in macronodular primary adrenal hyperplasia with or without mutation in the ARMC5 gene. 2018. 61 f.

The primary macronodular adrenal hyperplasia (PMAH) is a rare cause of Cushing's Syndrome (SC). It is characterized as macronodules in the adrenal gland and by variable production of cortisol. The nodules present an ectopic production of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) pituitary-independent. Several studies showed that the germ mutations in armadillo repeat cointaining 5 gene (ARMC5) are a frequent cause of PMAH. In addition, there is a participation of ectopic hormonal receptors in the adrenal cortex, which promotes steroidogenesis and hyperplasia of the gland. However, studies on a relationship between ARMC5 and aberrant receptor involvement in cortisol production are incipient. Therefore, our hypothesis is that ARMC5 gene may be involved in the cellular and functional pattern of the cells in PMAH. Thus, the objectives were to analyzed: 1) the proportion of spongiform and compact cells in sections stained with hematoxylin and eosin; 2) the gene expression in the spongiform cells and the gene and protein expression in both cells types of the ARMC5, the steroidogenic enzymes StAR, 36HSD2 and CYP17A1, and the ectopic receptors of vasopressin (AVP1AR), serotonin (5HT4R) and gastric inhibitory peptide (GIPR) also the ACTH ectopic and 3) the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) that shows the proliferation pattern in patients PMAH that present germline, germinative and somatic mutations or no mutation in ARMC5 gene. We showed that the hyperplastic nodules are mainly composed by spongiform cells independent of the ARMC5 mutation. The expression of ARMC5 in spongiform cells was higher in patients with mutation, and PMAH tissue have a higher expression of the ectopic receptors when compared with normal adrenal. With the immunohistochemical labeling, we observed the ARMC5 and StAR protein expression in both cell types. The 3BHSD2 enzyme was predominant in spongiform cells and the CYP17A1 enzyme in the compact cells. The expression of AVP1AR, 5HT4R, and ectopic ACTH was positive in both cell types regardless of the presence of the ARMC5 mutation, as well as the expression of the PCNA protein. Therefore, the results suggest that the mutation in ARMC5 is not involved with spongiform and compact cell function. Moreover, the presence of the AVP1AR, 5HT4R and GIPR receptors, the ectopic ACTH and the PCNA protein was not related to the gene mutation. In conclusion, the alterations in the ARMC5 gene are not involved in the cell functional pattern in the PMAH and in the onset of the nodules.

Keywords: ARMC5, Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia, Steroidogenic Enzymes, Ectopic Receptors.

Lista de Figuras

Figura 1: A glândula suprarrenal
Figura 2: Foto representativa de um nódulo da hiperplasia macronodular primária de paciente do cohort estudado, corado com hematoxilina e eosina (HE)
Figura 3: Enzimas e cascata esteroidogênica19
Figura 4: Esteroidogênese do córtex adrenal anormalmente mediada por receptores hormonais eutópicos ou ectópicos
Figura 5: Ilustração do receptor aberrante de GIP (GIPR)21
Figura 6: Imagens representativas do procedimento de análise realizada pelo sistema Neurolúcida
Figura 7: Imagem representativa da técnica de microdissecção
Figura 8: Análise dos tipos celulares presentes nos tecidos dos nódulos de PMAH
Figura 9: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína ARMC533
Figura 10: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína StAR
Figura 11: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína 3BHSD2
Figura 12: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína CYP17A137
Figura 13: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína AVP1AR
Figura 14: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína Serotonina (5HT4). 40
Figura 15: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína GIPR41
Figura 16 Figuras representativas da reação por imunoperoxidase de ACTH ectópico
Figura 17 Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína PCNA44
Figura 18 : Análise da expressão relativa do gene ARMC546
Figura 19 Análise da expressão relativa dos genes: A: 3βHSD; B: CYP11B1; C: CYP17A1; D: AVP1AR; E: 5HT4; F: GIPR

Lista de Tabela

Tabela 1 - Amostras de pacientes utilizados	25
Tabela 2 - Relação das sequencias de <i>primers</i> utilizados na reação de qRT-PCR	31
Tabela 3 - Resumo dos resultados da expressão dos parâmetros analisados nos tecido de pacientes com PMAH, com e sem mutação	os 45

Lista de Abreviaturas

- ACTH Hormonio Adrenocorticotrófico
- ARMC5 Contém repetição do Armadillo 5
- AVP1AR Receptor de Vasopressina 1
- CYP17A1 17α-hidroxilase/17,20-liase
- 3βHSD2 3β-hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2
- PCNA Antígeno nuclear de proliferação celular
- PMAH Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária
- SC Síndrome de Cushing
- StAR Proteína regulatoria aguda da esteroidogênese
- GIP Peptídeo inibitor gástrico
- GIPR Receptor do peptídeo inibitor gástrico
- MC2R Receptor de melanocortina do tipo 2
- 5HT4 Receptor 5-hidroxitriptamina (serotonina)

Sumário

1.Introdução	15
1.1 A Glândula Suprarrenal	15
1.2 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal	16
1.3 A Hiperplasia adrenocortical macronodular primária (PMAH)	17
1.4 A esteroidogênese adrenocortical	18
1.5.1 O Receptor de Peptídeo Inibitório Gástrico (GIPR)	21
1.5.2 Os receptores da Vasopressina (AVP)	21
1.5.3 Receptor de Serotonina (5HT4R)	22
1.7 Armadillo repeat containing 5 (ARMC5)	22
3. Objetivo Principal	24
3.1. Analisar em cortes histológicos de hiperplasias de pacientes portadores ou r mutações no gene <i>ARMC5</i> :	1ão de 24
3.2. Analisar em amostras de células espongiformes e compactas microdissecad cortes de hiperplasias de pacientes portadores ou não de mutações no gene AR	as de <i>MC5</i> :24
4. Material e Métodos	25
4.2 Análise morfológica dos tipos celulares	26
4.3 Análise da expressão proteica por reação de imunoistoquimica	27
4.4 Microdissecção a laser para isolamento de células individuais específicas e a da expressão gênica.	nálise 28
4.5 Análise estatística	31
5.Resultados	32
5.1 Análise morfológica e quantificação dos tipos celulares	32
5.2 Análise da expressão das proteínas ARMC5, StAR e das enzimas esteroidog	jênicas 32
5.3 A análise da expressão proteica dos receptores ectópicos	38
5.4 Análise da expressão proteica de ACTH ectópico	42
5.5 Análise da capacidade proliferativa através da expressão da proteína PCN	A42
5.6 Análise da expressão do gene <i>ARMC5</i> , das enzimas esteroidogênicas <i>3βHS</i> <i>CYP11B1, CYP17A1</i> e dos receptores ectópicos <i>AVP1AR, 5HT4R, GIPR</i> nas cé	D2, Iulas
6 Discussão	4040
U. DISCUSSAU.	40
6.1 Análise morfológica e quantificação dos tipos celulares	48

6.2 Análise gênica e da expressão das proteínas ARMC5, StAR e das enzimas	
esteroidogênicas	49
6.3 Análise gênica e da expressão das proteínas dos receptores ectópicos	50
7.Referências	54

1.Introdução

1.1 A Glândula Suprarrenal

Em humanos, as glândulas suprarrenais estão localizadas na cavidade abdominal em posição retroperitonial no polo superior de cada rim. São revestidas por uma cápsula conjuntiva e compostas por dois tecidos de origens e funções distintas. A medula adrenal é composta, principalmente, por células poliédricas denominadas de células cromafins, que se organizam em cordões e formam uma densa rede que engloba capilares e vênulas. Este tecido tem sua origem embriológica na neuroectoderme, mais especificamente, nas células da crista neural. A função básica da medula adrenal é sintetizar e secretar adrenalina e noradrenalina após estímulos nervosos. O córtex adrenal deriva da mesoderme da parede abdominal posterior, e é formado por células epitelióides com formato poliédrico. O córtex adrenal adulto é formado por 3 zonas celulares concêntricas, histologicamente bem definidas, que formam a zona glomerulosa (ZG), a zona fasciculada (ZF), e zona reticulada (ZR) (1). A ZG localiza-se na região mais externa do córtex adrenal, imediatamente abaixo da cápsula conjuntiva que envolve a glândula, e suas células dispõem-se em aglomerados arredondados envolvidos por capilares. Essas células são responsáveis pela síntese e secreção de mineralocorticoides, que estão associados com a homeostase dos eletrólitos do plasma sanguíneo. A ZF ocupa 75% do volume total da glândula suprarrenal, e apresenta células poliédricas com grande número de gotículas lipídicas em seu citoplasma. Essas células se organizam em colunas paralelas intercaladas por capilares, e tem como função básica a síntese e secreção de glicocorticoides, cuja produção é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A ZR é a zona mais próxima da medula e suas células dispõem-se em uma estrutura de rede entrelaçada com capilares. Suas células são menores do que as das demais zonas do córtex, contém pequena quantidade de lipídeos em seu citoplasma, e em humanos sintetizam e secretam andrógenos e estrógenos (2). A síntese e secreção dos corticoides produzidos pelas células do córtex adrenal são controlados pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA, em inglês, Hypothalamic



Figura 1: A glândula suprarrenal. (Adaptado de <u>www.gettyimages.com/detail/illustration/anatomy-of-adrenal-gland-cross-section-royalty-free-illustration/188057931</u>)

1.2 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

A função da glândula suprarrenal é o controle da homeostase do organismo. Estímulos nervosos nas células dos núcleos hipotalâmicos paraventricular e supraóptico estimulam a síntese de vasopressina e o hormônio liberador de corticotropina (CRH)(2). Por meio do sistema porta-hipofisário, o CRH é liberado na adenohipófise e estimula os corticotrofos a sintetizarem e secretarem o ACTH. As células do córtex adrenal apresentam um receptor específico para o ACTH, denominado receptor de melanocortina do tipo 2 (MC2R), que quando ativado pelo ACTH desencadeia uma sinalização para síntese de corticosteroides. ACTH estimula as células do córtex adrenal a sintetizarem esteroides a partir do colesterol, e esse processo envolve a participação de várias enzimas pertencentes à família do citrocromo P450 (3). O eixo HPA é regulado por retroalimentação negativa, ou seja, com o aumento da concentração do cortisol na corrente sanguínea, o eixo é blogueado através da inibição da produção do CRH e do ACTH, respectivamente, no hipotálamo e na adenohipófise (4) Alterações na regulação desse eixo que podem causar uma exposição excessiva e prolongada do organismo aos glicocorticoides secretados pelo córtex suprarrenal causam a Síndrome de Cushing (SC) (5). Descrita pela primeira vez por Harvey Cushing em 1932, a SC é classificada como dependente ou independente do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (6). As lesões unilaterais observadas, como adenomas e carcinomas correspondem a 90-95% e estão entre as causas da SC independente de ACTH. As lesões bilaterais são menos comuns e incluem a Hiperplasia Micronodular Pigmentosa Primaria (PPNAD) e a Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária (PMAH).

1.3 A Hiperplasia adrenocortical macronodular primária (PMAH)

Descrita pela primeira em 1964 por Kirschner e colaboradores (7) a PMAH é uma causa rara de SC. Caracteriza-se pela presença de macronódulos funcionantes, geralmente em ambas as suprarrenais, e por uma produção variável, autônoma e sustentada de cortisol. Louiset e colaboradores (2013) mostraram uma produção ectópica de ACTH nos nódulos da PMAH com provável ação autócrina e parácrina, que pode desencadear a cascata esteroidogênica e a produção de cortisol, demonstrando que a doença é independente do ACTH hipofisário (3,7). Até recentemente, a PMAH era detectada quando apresentada sob a forma de SC manifesta, em torno da 5° ou 6° década de vida, e com discreta prevalência para o sexo feminino (8). Atualmente, sabe-se que a forma subclínica parece ser a apresentação mais frequente da doença, mas que se encontra sub-diagnosticada (9). Macroscopicamente é representada pela formação de múltiplos nódulos, em ambas adrenais, de coloração amarelada devido à alta concentração lipídica, e com dimensões variáveis, podendo chegar a vários centímetros. O desenvolvimento nodular pode ser não sincrônico, o que dificulta o diagnóstico. A análise microscópica dos nódulos hiperplásicos mostra certa heterogeneidade celular formada por dois grupos celulares distintos (Figura 2). Um grupo é formado por células de citoplasma claro (ricas em lipídios) chamadas de células espongiformes, e o outro constituído por células compactas com pouco citoplasma (pobre em lipídios), dispostas em estruturas semelhantes a ninhos ou ilhas (10).



Figura 2: Foto representativa de um nódulo da hiperplasia macronodular primária de paciente do cohort estudado, corado com hematoxilina e eosina (HE). São mostradas células espongiformes, com citoplasma claro rico em lipídeos (seta vermelha), e células compactas agrupadas e pobres de lipídeos (seta branca).

Estudos utilizando hibridização *in situ* mostraram que a enzima 3β-hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2 (3βHSD2) é detectada principalmente nas células espongiformes, enquanto a enzima 17α-hidroxilase/17,20-liase (CYP17A1) nas células compactas. Esta expressão diferencial ocorre exclusivamente na PMAH (11). As outras enzimas esteroidogênicas estão presentes nos dois tipos celulares, mas frequentemente apresentam uma expressão reduzida. Como a PMAH apresenta esteroidogênese ineficiente, o hipercortisolismo parece estar mais relacionado à hiperplasia das células adrenocorticais (12). Porém não existem relatos na literatura sobre qual a proporção entre células espongiformes e compactas, e se esses tipos celulares são estados funcionais diferentes de um mesmo tipo celular, ou ainda se são células em diferentes estágios de diferenciação celular.

1.4 A esteroidogênese adrenocortical

O ACTH é o principal regulador da síntese de cortisol e de andrógenos pelo córtex adrenal. Em condições fisiológicas, quando a molécula de ACTH se liga ao MC2R, que se encontra no córtex adrenal acoplado à proteína G, ocorre uma alteração da conformação estrutural do MC2R. Essa alteração de conformação do receptor ativa uma proteína G estimulatória (Gs), o que determina a dissociação da subunidade alfa (α) do GDP e sua ligação à guanidina trifosfato (GTP). Uma vez que o GTP está acoplado à subunidade α , essa última assume a conformação ativada, se separa do receptor e do dímero $\beta\gamma$ e ativa

o efetor, a adenilato ciclase (AC). A ativação da AC gera cAMP a partir do ATP, que se liga a domínios específicos da unidade regulatória da proteína quinase dependente de cAMP ou Proteína quinase A (PKA), que libera unidades catalíticas que irão fosforilar diferentes alvos intracelulares. Um dos alvos da PKA é a proteína ligante ao elemento responsivo ao cAMP (CREB), que é um fator de transcrição que estimula a expressão do gene das enzimas esteroidogênicas (9). A via PKA ativada também aumenta a internalização de ésteres de colesterol que é transportado e internalizado na mitocôndria pela ação da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR) para a produção dos esteroides. As enzimas esteroidogênicas são enzimas do citocromo P450 (CYP) localizadas na mitocôndria, que são enzimas de clivagem da cadeia lateral do colesterol, como as enzimas colesterol desmolase-CYP11A1, CPY11B1-hidroxilase, CPY11B2-hidroxilase, aldosterona sintase. Na mitocôndria o colesterol é clivado primeiramente pela enzima colesterol desmolase-CYP11A1 formando a pregnenolona que se dirige para o retículo endoplasmático liso. No reticulo endoplasmático, a pregnenolona é clivada pela enzima CYP17A1-hidroxilase em 17α-hidroxidopregnenolona, que sofrerá a ação da enzima 3βhidroxiesteroide desidrogenase tipo II (3 β HSD2) dando origem a 17 α -hidroxiprogesterona. Esta, por sua vez, será clivada por outra enzima da família citocromo P450, a CYP21hidroxilase dando origem ao 11-desoxicortisol. Esse retornará para a mitocôndria, para etapa final, onde sofrerá ação da enzima CYP11B1-hidroxilase que catalisará 11desoxicortisol em cortisol (Figura 3) (13).





1.5 Os receptores ectópicos

A esteroidogênese pode ser anormalmente regulada pela ativação de receptores hormonais ectópicos e/ou aberrantemente expressos no córtex adrenal (Figura 4), que mimetizam os eventos celulares desencadeados pela ação do ACTH após ativação do receptor MC2R. O conceito de receptores hormonais ilícitos, ectópicos, ou eutópicos, mas aberrantemente expressos nas adrenais, foi proposto pela primeira vez pelo grupo de Robert Ney em 1971 (14). De fato, a esteroidogênese pode ser estimulada por receptores ectópicos que não são expressos em níveis significantes na ZF normal, como o receptor do peptídeo inibitório gástrico (GIPR), receptores beta-adrenérgicos (β-AR), receptores da vasopressina (V2-V3R), receptor da serotonina (5-HTR) e receptor do glucagon (GCGR) (9). A manifestação clínica desses receptores aberrantes eventualmente pode resultar num certo padrão de SC, como aquele SC-dependente de alimento devido a presença de GIPR, embora na maioria dos casos a presença desses receptores não modifique a apresentação clínica da CS.



Figura 4: Esteroidogênese do córtex adrenal anormalmente mediada por receptores hormonais eutópicos ou ectópicos. [Adaptado de Lacroix et al., 2001].

Em pacientes diagnosticados com PMAH, é frequente a regulação aberrante da secreção de cortisol que ocorre devido a expressão do receptor de GIP (GIPR), dos receptores da vasopressina (AVP1AR) e do receptor da serotonina, *5*-hidroxitriptamina (5-HT4). Portanto, a esteroidogênese pode ser estimulada por outros hormônios que não o ACTH, como descrito em vários casos de PMAH (15,16).

1.5.1 O Receptor de Peptídeo Inibitório Gástrico (GIPR)

A presença de GIPR foi detectada em células adrenais de pacientes que apresentavam SC-dependente de alimento, mas não naqueles com SC-não dependentes (17). As células isoladas desses pacientes responderam de forma dose-dependente à ação do ACTH e do GIP na ativação da esteroidogênese, enquanto as células adrenais normais responderam apenas ao ACTH. Nesses pacientes, após a ingestão de alimentos, GIP é liberado em concentrações fisiológicas pelas células K do duodeno e do intestino delgado, que se liga ao GIPR ectópico adrenal. Como resultado há aumento supra fisiológico pós-prandiais do cortisol plasmático, que exerce regulação negativa na síntese de CRH e ACTH (Figura 5). Lacroix e colaboradores (1992) mostraram que a incubação de células adrenais provenientes de nódulos de PMAH secretam cortisol *in vitro* mediado por GIP, mas não em células adrenais adultas ou fetais normais ou em outros adenomas (18).



Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia

Figura 5: Ilustração do receptor aberrante de GIP (GIPR). [Adaptado de Lacroix et al 2001].

1.5.2 Os receptores da Vasopressina (AVP)

As ações da AVP são mediadas por três receptores acoplados à proteína G. Os receptor V1A ou AVP1AR está expresso principalmente nas células de músculo liso vascular, nas suprarrenais, fígado, plaquetas e cérebro (19). O receptor V2 está expresso nos rins (20) e o receptor V3 (V1B) possivelmente nos rins (21). Estudos mostraram que a AVP estimula diretamente o crescimento e a esteroidogênese em células adrenais em ratos, bovinos, cães e rã (22-25), e a secreção de cortisol de células adrenais humanas normais *in vitro* (25,26), através da ativação do receptor AVP1AR. Lacroix e colaboradores (27) detectaram a regulação do cortisol influenciada pela postura e pela ação da AVP em paciente com PMAH e SC. Em indivíduos normais a AVP aumenta a produção de cortisol estimulando diretamente a secreção de ACTH e indiretamente pela potencialização dos efeitos do CRH (28).

1.5.3 Receptor de Serotonina (5HT4R)

Em células adrenocorticais humanas a serotonina estimula a secreção de cortisol *in vitro* através da ativação do receptor 5HT4 (29). A 5HT4 é um receptor que pode mediar a regulação da produção de corticosteroides nas adrenais por meio de um mecanismo parácrino (30). Este receptor pode ser encontrado principalmente nas células da zona glomerulosa, mas também nas células da zona fasciculada (31).

Além dessas alterações acima descritas um recente e importante achado por dois grupos independentes (32,33) foi a identificação de mutações germinativas e somáticas no gene Armadillo repeat containing 5 (ARMC5) primeiramente em 55% (32) dos casos, e 25% em trabalhos mais recentes (34).

1.7 Armadillo repeat containing 5 (ARMC5)

As proteínas da família Armadillo (32) são caracterizadas por apresentar repetições de aproximadamente 42 aminoácidos compostas por 3 α -hélices, que foram caracterizadas primeiramente em segmentos de proteínas Armadillo em *Drosophila* (35). Uma das proteínas da família Armadillo mais estudadas é a β -catenina (*CTNNB1*), que é uma proteína associada à caderina, que apresenta interações com outras proteínas. Tem funções relacionadas ao desenvolvimento, à adesão celular e à ativação da sinalização Wnt, regulando a expressão de genes relacionados à proliferação celular (39). Estudos sobre a ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina (34,36,) mostraram um papel importante dessa via no prognóstico de tumores adrenocorticais. Assim como a β -catenina, Assié e colaboradores (35) demonstraram que a proteína ARMC5 leva à morte celular quando o gene *ARMC5* foi transfectado em células da linhagem de carcinoma adrenocortical humana, células H295R. A inativação da proteína devido a mutações inativadoras do gene *ARMC5* levaram à diminuição da expressão do receptor de ACTH, o

receptor MC2R, e das enzimas esteroidogênicas adrenais. A descrição de mutações germinativas no gene *ARMC5* em pacientes diagnosticados com PMAH levantou a hipótese da associação desta proteína com o desenvolvimento da doença, em casos esporádicos e na forma familial (32,35,). A existência de um segundo evento, isto é, mutação somática nos diferentes nódulos sugere que o ARMC5 seja um gene supressor de tumor (36), de acordo com a Teoria de Knudson de dois eventos (37). No entanto, nem todos os pacientes apresentam as mutações germinativa e somática ou perda de heterozigose, isto é, há pacientes que apresentam apenas a mutação germinativa. No momento, ainda não é conhecida a relevância do segundo evento para o quadro clínico da doença, o que reforça a necessidade de analisar os grupos de pacientes com PMAH sem mutação, com mutação germinativa e com mutação germinativa e somática, separadamente.

A PMAH é independente do ACTH hipofisário na produção de cortisol e que, além do *ARMC5*, pode haver o envolvimento de outros fatores no seu processo fisiopatológico, a exemplo dos receptores aberrantes, que podem ser importantes na produção de cortisol, mas também na desregulação do processo de proliferação celular. Até o momento não foram realizados estudos comparando as diferentes características descritas na PMAH e a presença da mutação germinativa, germinativas e somáticas e sem mutação no gene *ARMC5* quanto a proporção de células espongiformes e compactas; pois ainda não foram descritas a proporção desses tipos celulares na PMAH e qual o impacto dessas na síntese do cortisol. Além disso, quais desses tipos celulares expressam as enzimas, StAR, 3βHSD2 e CYP17A1 e quais são os receptores e ACTH ectópico expressos nesses tipos celulares. Portanto, nesse trabalho temos como hipótese que a presença ou não da mutação do gene ARMC5 nas hiperplasias pode estar envolvida no padrão celular e funcional das células que compõem os nódulos hiperplásicos.

3. Objetivo Principal

Avaliar a condição morfológica e funcional das adrenais de pacientes diagnosticados com PMAH, portadores ou não de mutações no gene *ARMC5*.

Objetivos específicos

3.1. Analisar em cortes histológicos de hiperplasias de pacientes portadores ou não de mutações no gene *ARMC5*:

- a proporção de células espongiformes e compactas por análise de imagem em cortes corados com hematoxilina e eosina (HE).
- a expressão da proteína ARMC5 por reação de imunoistoquímica.
- a expressão das enzimas esteroidogênicas 3BHSD2, StAR e CYP17A1 por imunoistoquímica, para avaliação do estado funcional das células.
- a expressão de receptores ectópicos (5HT4, AVP1AR, e GIPR) e ACTH ectópico, por reação de imunoistoquímica.
- o padrão proliferativo através da expressão da proteína PCNA, por reação de imunistoquimica.

3.2. Analisar em amostras de células espongiformes e compactas microdissecadas de cortes de hiperplasias de pacientes portadores ou não de mutações no gene *ARMC5*:

- a expressão gênica das enzimas *StAR, 3βHSD2, CYP17A1, CYP11B1*.
- a expressão dos receptores ectópicos/aberrantes (5HT4, AVP1AR e GIPR).

4. Material e Métodos

4.1 Pacientes

Foram analisadas 16 amostras de pacientes diagnosticados com PMAH. Foram 13 pacientes do sexo feminino e 3 do sexo masculino classificadas em 3 grupos: Grupo 1) sem mutação no gene ARMC5 (n=6) com idade média de 57.0 \pm 6.8 anos e 1 caso diagnosticado com SC; Grupo 2) com mutação germinativa (n=5) com idade média de 51.8 \pm 7.5 anos com 3 pacientes diagnosticados com SC e Grupo 3) com mutação germinativa e somática (n=5) com idade média e 50.4 \pm 8.9 anos.

Paciente	Idade	Sexo	Grupo	Tipo de	Mutação
				Sangue	Tecido de PMAH
1	53	F	Sem Mutação		
2	50	F	Sem Mutação		
3	50	М	Sem Mutação		
4	69	F	Sem Mutação		
5	61	F	Sem Mutação		
6	59	F	Sem Mutação		
7	63	F	Germinativa	c.476 -1G>C (hetero)	c.476 -1G>C (hetero)
8	56	F	Germinativa	c.1158G>A; p.Trp386* (hetero)	c.1158G>A; p.Trp386* (hetero)
9	52	М	Germinativa	c.280_281delTC, p.Ser94Valfs*8	c.280_281delTC, p.Ser94Valfs*8
10	41	F	Germinativa	(hetero) c.170_171insA, I58Nfs*45 (hetero)	(hetero) c.170_171insA, I58Nfs*45 (hetero)
11	47	F	Germinativa	c.799C>T, p.Arg267*, rs369721476 (hetero)	c.799C>T, p.Arg267*, rs369721476 (hetero)
12	49	F	Germinativa e Somática	c.1181T>C, p.Leu394Prol (hetero)	c.1181T>C, p.Leu394Prol (hetero) c.1559_1559delG;
13	45	F	Germinativa e Somática	c.170_171insG, lle58Asnfs*45 (hetero)	Gly520Aspfs*24 (hetero) c.170_171insG, lle58Asnfs*45 (hetero) Perda de heterozigose

Tabela 1. Amostras de pacientes utilizados

14	45	Μ	Germinativa e Somática	c.2423A>C, p.His808Pro (hetero)	c.2423A>C, p.His808Pro (hetero) c.283_295delTCGGCCGCGTCG GG, p.Ser95Serfs*2 (hetero)
15	45	F	Germinativa e Somática	c.165_166insG, p.lle58Asnfs*45, (hetero)	c.165_166insG, p.Ile58Asnfs*45, (hetero) c.2082_2088delCCCGCTC,p.Pro 695Serfs*20, (hetero)
16	68	F	Germinativa e Somática	c.1960C>T, p.Arg654*, (hetero)	c.1960C>T, p.Arg654*, (hetero) c.294_294delG; p.Gly99Glufs*38 (hetero)

4.2 Análise morfológica dos tipos celulares

Foram analisadas secções de fragmentos de nódulos de hiperplasia de pacientes identificados com mutação germinativa, com mutações germinativa e somática do gene ARMC5 e pacientes que não tiveram identificadas mutações nesse gene. Esse material foi disponibilizado pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e preparados em parafina pelo Departamento de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), que realizou os cortes histológicos de 7µm de espessura. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol a 60°C–65°C, por 30 minutos, 3 vezes, seguido de reidratação em bateria de álcool (absoluto, 95% e 70%). Posteriormente, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina de Putt (HE) e as lâminas montadas com lamínula em Entelan (Merck, Darmstadt, Alemanha,). Foram analisados 5 cortes/paciente pelo software Neurolúcida utilizando microscópio óptico de luz Nikon (MBF Bioscience., Williston, VT 05495 EUA). Em cada corte foram analisados 5 campos/áreas, aleatoriamente escolhidos, onde as áreas de células compactas e espongiformes foram quantificadas em relação à área total. A secção foi delimitada em sua área total em µm² aonde foram analisados aleatoriamente 10 campos contendo grupos de células compactas. A área de células espongiformes foi determinada pela subtração da área de células compactas da área total da secção. Foi possível a análise de somente 3 pacientes por grupo devido a falta de mais material disponibilizado.



Figura 6: Imagens representativas do procedimento de análise realizada pelo sistema Neurolúcida. A e B: delimitação da área total do corte; C e D: delimitação das áreas de grupos de células compactas.

4.3 Análise da expressão proteica por reação de imunoistoquimica

Após o processo de desparafinização e reidratação dos cortes foi realizada recuperação antigênica através da imersão para lâminas em ácido cítrico (pH 6,0) por 30 minutos a 96°C, na utilização dos anticorpos anti-PCNA (Abcam, ab29), anti-StAR (Abcam, ab58013), anti-3 β HSD2 (Abcam, ab154385) e anti-CYP17A1 (Abcam, ab134910). Para os anticorpos anti-ACTH (Abcam, ab74976), anti-ARMC5 (Abcam, ab17025), anti-AVP1AR (Santa Cruz, sc30025), anti-GIPR (Abcam, ab209792) e anti-5HT4R (Abcam, ab219116) foi utilizado para a recuperação antigênica o tampão Tris-EDTA (pH 9,0) por 30 minutos a 96°C. Após resfriamento à temperatura ambiente foi realizado o bloqueio da peroxidasse endógena em tampão de 50% de H₂O₂, por incubação de 2 vezes por 10 minutos cada. Em seguida foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com tampão fosfato sem Ca²⁺ e Mg²⁺ (PBSA) contendo soro de cavalo 5% (Kit ABC Vectastain, pk6200), por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com os

anticorpos primários anti-StAR (1:200), anti-3βHSD2 (1:250), anti-PCNA (1:100), anti-ARMC5 (1:150), anti-ACTH (1:50), anti-CYP17A1 (1:100), anti-AVP1AR (1:50), anti-GIPR (1:1000), anti-5HT4R (1:50) diluídos em PBSA contendo 5% de soro (Kit Vector), em câmara úmida. Após lavagem das lâminas por 3 vezes por 5 minutos em PBSA, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado universal (Kit ABC Vectastain, pk6200) por 1 hora. Após lavagem por 3 vezes de 5 minutos em PBSA, foi aplicado o complexo AB (1:100) do Kit ABC Vectastain, por 1 hora à temperatura ambiente. Após 3 lavagens por 5 minutos em PBSA, os cortes foram incubados com Diaminobenzidina 3,3' (DAB, Sigma, D8001) por 2 minutos, contra-corados com hematoxilina por 2 minutos, e montados com Entelan (Merck, Darmstadt, Alemanha,). Foram analisadas a presença ou ausência de marcação para a expressão das enzimas esteroidogênicas, receptores ectópicos e da proteína PCNA. Os resultados estão apresentados em painéis contendo figuras representativas do material de pacientes e os controles negativos, aonde na reação o anticorpo primário não foi adicionado e os controles positivos, quando necessário.

4.4 Microdissecção a laser para isolamento de células individuais específicas e análise da expressão gênica.

Com o intuito analisar individualmente os tipos celulares da PMAH foram realizados microdissecções nos cortes congelados de fragmentos de tecido de PMAH. Os cortes congelados a -80°C de fragmentos de tecido de PMAH congelados, cedidos pelo LIM42 da FMUSP, foram preparados no Laboratório de Neurologia da FMUSP (LIM 15) em lâminas próprias para microdissecção a laser (ThermoFisher, Arcturus®, LCM0522,). A microdissecção a laser (LCM) foi realizada em um microscópio invertido Nikon Eclipse® Ti-E com um sistema computadorizado Arcturus® AutoScanXT™, que permite identificar áreas a serem microdissecadas. A utilização desse sistema foi gentilmente permitida pelo departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, cujo responsável é o Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes. O corte histológico deve se localizar no centro da lâmina, que está fixada ao microscópio. Um mecanismo articulado ao microscópio se acopla a um cap plástico transparente que possui um filme o CapSure® LCM, e alinha o tecido à posição específica de interesse. A imagem (células isoladas ou grupos celulares) é visualizada em um monitor permitindo orientar a dissecção por disparos sucessivos de feixes de laser de alta precisão. A base do microscópio é movida por um cursor para colocar a área de interesse no campo óptico. A microdissecção foi realizada pela pulsação do laser do sistema ArcturusXT[™], através da *cap*, que ativa a película que

o reveste para aderir o grupo de células delimitado ao cap. Ao final, o cap foi retirado do sistema e acoplado a um Ependorff com tampão de extração de RNA, previamente aquecido a 42°C. O material obtido foi centrifugado por 2 minutos á 12.300 rpm e armazenado a -80°C. O RNA total foi extraído utilizando o kit de extração PicoPure® RNA Isolation kit. A concentração de RNA de cada amostra foi determinada por espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies (Wilmington, DE, USA) pela absorbância em 260 nm utilizando como valor padrão uma unidade de densidade óptica (DO) que equivale a 50 µg/mL de RNA. O grau de pureza foi avaliado pela relação 260/280 nm, que deve ser superior a 1,8 para ácidos nucleicos. A síntese de cDNA foi realizada a partir concentração de RNA total de cada amostra em um volume final de 11 µL (RNA + H₂O). As reações foram executadas com a utilização do kit de síntese SuperScript III First Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, USA). A amostra obtida foi incubada no termociclador nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e, finalmente, por 5 minutos a 85°. As reações foram preparadas a partir de cDNA pelo método SYBR Green para análise de expressão gênica relativa dos genes ARMC5, 3BHSD2, CYP17A1, CYP11B1, 5HT4, GIP, AVPRV1 (Tabela 2). O gene endógeno foi o gene GUS e a expressão relativa foi analisada a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre os valores de CT selecionados de uma dada amostra e o CT de um pool comercial de adrenais normais (Clontech, Palo Alto, CA).



Figura 7: Imagem representativa da técnica de microdissecção. A: imagem ilustrativa do *cap* posicionado sobre o corte; B: delimitação da área de interesse a ser micordissecada; C: determinação dos focos de laser;
D: laser de alta precisão aderindo o tecido ao *cap*; E: laser UV seccionando a área previamente delimitada;
F e G área do tecido de interesse aderida ao *cap* para extração de RNA. [Adaptado de http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/ab/applications-technologies/LCM/LCM_UV_video.html]

Gene Forward Reverse pb AGCCAGTTCCTCATCAATGG GGTAGTGGCTGGTACGGAAA GUS 160 ARMC5 CTCGGAGGCATACTCCCTTT GTTCGGTTCTGGATGCTGTC 68 3BHSD2 GAGGCAGTAAGGACTTGGACT CGTGGCCAATCCAAAGTAGC 142 AGCCGCACACCAACTATCAGTGAC TCACCGATGCTGGAGTCAACGTTG 169 CYP17A1 **CYP11B1** AGGAGACCTTGCGGCTCTACC GAACACGCGCACCAATGTC 110 AVP V1a CGGCTTCATCTGCTACAACATC CGAGTCCTTCCACATACCCGT 105 CGGGCAGGAGCCTCCTCCGAGAG CAAGGGACAGTCTGGCCCAGAATG 347 5HT4 GIPR CCTGATCGCCCCTGCACGAAC AGGTCGAGGTAGCAGACGGTCTCG 326 pb = pares de bases

Tabela 2. Relação das sequencias de primers utilizados na reação de qRT-PCR

4.5 Análise estatística

Foi utilizado o teste t (não paramétrico), e ANOVA sendo que foi considerado significante a diferença quando *p*<0.05, através do programa GraphPad Prism 6.

5.Resultados

5.1 Análise morfológica e quantificação dos tipos celulares

A análise dos tipos celulares presentes no tecido de pacientes diagnosticados com PMAH mostrou que a área que compreende as células compactas (C) é significantemente menor em relação à área de células espongiformes (E), independente da presença ou tipo de mutação no gene *ARMC5* (Figura 8).



Figura 8: Análise dos tipos celulares presentes nos tecidos dos nódulos de PMAH de pacientes com mutação germinativa (Germ), com mutação germinativa e somática (Gem+Som) e sem mutação do gene ARMC5 (S/Mut). C=células compactas; E=células espongiformes; n=3.Teste Anova.

5.2 Análise da expressão das proteínas *ARMC5, StAR* e das enzimas esteroidogênicas

A Figura 9 apresenta figuras representativas da expressão da proteína ARMC5 analisadas nos tecidos de PMAH de pacientes sem mutação, com mutação germinativa, e germinativa e somática no gene *ARMC5*. Na Figura 9 (A-F) podemos observar uma marcação positiva citoplasmática por toda extensão do corte em todos os grupos e em ambos os tipos celulares, células compactas (seta preta) e célula espongiformes (seta vermelha). Em todos os painéis, o controle negativo das reações está nos insertos das figuras.

ARMC5



Figura 9: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína ARMC5. Células compactas (seta preta), e células espongiformes (seta vermelha). Os insertos das figuras A-C são os controles negativos.

Para investigar se haveria um envolvimento diferente dos tipos celulares na função esteroidogênica dos nódulos de PMAH, analisamos a proteína StAR e diferentes enzimas esteroidogênicas. Na Figura 10 comparamos a expressão da proteína StAR nas amostras de tecido de PMAH de pacientes com e sem mutação no gene *ARMC5*. Observamos uma marcação positiva e heterogênea (Figura 10 A-F) em ambos os tipos celulares, porém, nem todas as células apresentam marcação. Nas figuras de maior aumento (Figura 10 D-F) observamos que a marcação ocorre no citoplasma de ambos os tipos celulares (células compactas-seta preta; células espongiformes-seta vermelha), em amostras de pacientes com e sem mutação no gene *ARMC5*. No entanto, a intensidade de marcação é diferente em corte de tecido que não apresenta mutação no gene *ARMC5*, quando comparado com os que apresentam mutação. Por sua vez, os tecidos com mutação apresentam a mesma intensidade de marcação da proteína StAR.

A análise da expressão da enzima 3βHSD2 mostrou que existem áreas de marcação positiva e negativas adjacentes a elas (Figura 11 A-F). Nas figuras com maior aumento (Figura 11 D-F) observamos que há predominância de marcação citoplasmática das células espongiformes (seta vermelha), enquanto as células compactas (seta preta) não apresentam marcação evidente.

A expressão da enzima CYP17A1 está representada predominantemente nas células compactas (Figura 12 A-F). No aumento maior (Figura 11 D-F) observamos uma marcação citoplasmática em ambos os tipos celulares e mais intensa nas células compactas (seta preta), quando comparada com as células espongiformes (seta vermelha).

O padrão de marcação da expressão das enzimas 3βHSD2 e CYP17A1 ocorre independente da presença ou tipo de mutação no gene *ARMC5*.

Os resultados da expressão da proteína StAR e das enzimas esteroidogênicas sugerem capacidade de produção de esteróides distintas entre glândulas de pacientes com mutação e sem mutação no gene *ARMC5*. No entanto, o mesmo não pode ser observado entre glândulas que apresentam mutações germinativas ou germinativas e somáticas.

StAR



Figura 10: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína StAR. Células compactas (seta preta), e células espongiformes (seta vermelha). Os insertos das figuras A-C são os controles negativos.

3βHSD2



Figura 11: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína 3BHSD2. Células compactas (seta preta), e células espongiformes (seta vermelha). Os insertos das figuras A-C são os controles negativos.

CYP17A1

Sem Mutação

Germinativa

Germinativa e Somática



Figura 12: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína CYP17A1. Células compactas (seta preta), e células espongiformes (seta vermelha). Os insertos das figuras A-C são os controles negativos.

5.3 A análise da expressão proteica dos receptores ectópicos

Com o intuito de identificar os tipos celulares que expressam os receptores ectópicos nos nódulos de PMAH foram analisados os receptores da vasopressina (AVP1AR), da serotonina (5Ht4R) e receptor do GIP (GIPR). A Figura 13 (A-F) compara a expressão do AVP1AR nas diferentes amostras de PMAH de pacientes com e sem mutação, em que observamos um padrão homogêneo de marcação citoplasmática por toda extensão do corte. Esse padrão ocorre em ambos os tipos celulares, células compactas (seta preta) e células espongiformes (seta vermelha), independente da presença e tipo de mutação. Na Figura 14 (A-F) observamos a expressão do receptor 5HT4R, em que cortes de tecido de PMAH portadores de mutações no gene *ARMC5* apresentam uma expressão mais intensa do receptor de 5HT4 do que aqueles sem mutação. No entanto, não observamos diferença de marcação entre os tipos celulares, células espongiformes e compactas.

A análise da expressão proteica do GIPR mostra que esse receptor não está expresso nas amostras de PMAH de pacientes analisados, independente da presença ou não da mutação no gene *ARMC5* (Figura 15 B-D). O controle positivo foi realizado em tecido do pâncreas, cujas células do tipo alfa da ilhota pancreática expressam esse receptor (Figura A).

AVP1AR



Figura 13: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína AVP1AR. Células compactas (seta preta), e células espongiformes (seta vermelha). Os insertos das figuras A-C são os controles negativos.

5HT4R

Sem Mutação

Germinativa

Germinativa e Somatica



Figura 14: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína Serotonina (5HT4). Células compactas (seta preta), e células espongiformes (seta vermelha). Insertos - controles negativos. Os insertos das figuras A-C são os controles negativos.



Figura 15: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína GIPR. Imagem A tecido de pâncreas (controle positivo da reação), insertos controles negativos da reação. Os insertos das figuras A-C são os controles negativos.

GIPR

5.4 Análise da expressão proteica de ACTH ectópico

Com objetivo de investigar qual tipo celular estaria produzindo o ACTH ectópico, analisamos a expressão do ACTH nos cortes de tecidos de PMAH. Na Figura 16 (A-F) observamos que há marcação positiva citoplasmática fraca em ambos os tipos celulares, mas que parece mais evidente nos cortes de tecidos sem mutação.

5.5 Análise da capacidade proliferativa através da expressão da proteína PCNA

A expressão da proteína PCNA (Figura 17 A-F) como esperado é nuclear e em ambos os tipos celulares. No entanto, a marcação é mais homogênea e com expressão menos intensa nos cortes que não apresentam mutação no gene *ARMC5*. Esse resultado sugere que as glândulas de pacientes que apresentam mutação no gene *ARMC5* poderiam apresentar um potencial de proliferação maior que os sem mutação. No entanto, esse potencial é similar nos dois tipos celulares, células compactas (seta preta) e células espongiformes (seta vermelha).

A Tabela 3 reúne os dados da análise qualitativa da reação por imunoperoxidase dos parâmetros acima analisados nos grupos de amostras de pacientes portadores e não portadores de mutação no gene *ARMC5*. O símbolo (+) significa marcação positiva para a proteína e o símbolo (-), marcação negativa nos tipos celulares, células compactas (C) e células espongiformes (E).

ACTH



Figura 16: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase de ACTH ectópico. Insertos - controles negativos

PCNA



Figura 17: Figuras representativas da reação por imunoperoxidase da proteína PCNA. Células compactas (seta preta), e células espongiformes (seta vermelha). Insertos - controles negativos

Tabela 3.	Resumo dos	resultados	da expressão	dos parâmetros	s analisados r	nos tecidos de	pacientes con	n PMAH,	com e sem
mutação.									

	ARI	MC5	St	AR	3βHSD2		CYP17A1		AVP1AR		GIPR		5HT4R		ACTH		PC	NA	
	С	E	С	E	С	Е	С	E	С	E	С	E	С	Е	С	E	С	Е	
Sem Mutação	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
Germinativa	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	++	++	
Germinativa e Somática	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+•	• ++	
Resultado	Se	em	Se	em	Expre	essão	Expre	Expressão		Sem		Sem		essão	Sem		Inten	sidade	
	difer	ença	difer	ença	na	Ε	na	na C		diferença		marcação		com mutação		diferença		maior com mutação	

5.6 Análise da expressão do gene *ARMC5*, das enzimas esteroidogênicas *3βHSD2*, *CYP11B1*, *CYP17A1* e dos receptores ectópicos *AVP1AR*, *5HT4R*, *GIPR* nas células espongiformes.

A expressão do gene *ARMC5* nas células espongiformes de paciente não portadores e portadores de mutação nesse gene foi comparada utilizando como padrão um *pool* comercial de adrenais normais e o gene normalizador endógeno *GUSB* (Figura 18). Os resultados da análise de células de pacientes sem mutação e com mutação mostraram que as células espongiformes com mutação apresentaram uma expressão significantemente (p = 0.045) maior em relação às amostras de pacientes sem mutação.



Figura 18: Análise da expressão relativa do gene ARMC5, nas células espongiformes de paciente não portadores de mutação no gene ARMC5 (N=5) e portadores (N=8), test t p= 0,0451

A análise da expressão gênica das enzimas esteroidogênicas *3βHSD2*, *CYP11B1*, e *CYP17A1* e dos receptores ectópicos *AVP1AR*, *5HT4R*, *GIPR* em células espongiformes de tecido de nódulos de PMAH de pacientes com e sem mutação, não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados estão agrupados na Figura 19 (A-F).



Figura 19: Análise da expressão relativa dos genes: A: 3βHSD; B: CYP11B1; C: CYP17A1; D: AVP1AR; E: 5HT4; F: GIPR nas células espongiformes de paciente não portadores de mutação no gene ARMC5 (n=5-6) e portadores (n=7-9). Teste t não paramétrico.

6. Discussão.

6.1 Análise morfológica e quantificação dos tipos celulares

Tumores adrenais associados a SC tem características histológicas próprias. Tumores malignos apresentam estruturas lobulares, com áreas necróticas e hemorrágicas aparentes, compostas principalmente por células com citoplasma compacto e eosinófilo arranjadas em fascículos ou alvéolos. Além disso, apresentam alta atividade mitótica e capacidade de invasão. Por outro lado, os tumores benignos são arredondados e apresentam coloração amarelada, compostos por células "claras" com intensa carga lipídica, semelhantes às células da zona fasciculada (38). Os nódulos de PMAH, guando descritos pela primeira vez em 1964 por Kirschner e colaboradores (7), foram caracterizados pela presença de células que se assemelhavam às da zona fasciculada, com limites celulares distintos e citoplasma pálido. Nos nódulos maiores havia a presença de cordões de células menores, com citoplasma eosinófilo, irregularmente intercalados. Por outro lado, Aiba e colaboradores (1991) descreveram a presença de pequenas ilhotas de células compactas dentre uma população de células claras, independentemente do tamanho do nódulo, cuja descrição foi confirmada por Dobbie e colaboradores (39). Posteriormente Bisi e colaboradores (1999), descrevam que as células "claras" aparentavam armazenamento de lipídeos e monotonia nuclear, características típicas de células do córtex adrenal, enquanto as células de citoplasma compacto apresentavam núcleo mais vesiculoso e nucléolo proeminente, indicativo de maior síntese celular (40). Neste trabalho avaliamos se os nódulos de pacientes com e sem mutação apresentavam o mesmo padrão já descrito. Observamos que, independente da presença e do tipo de mutação no gene ARMC5, germinativa e germinativa/somática, a área que compreende as células compactas é significantemente menor em relação à área de células espongiformes. Somente na hiperplasia de um paciente do nosso coorte, observamos que as células compactas compunham a maior parte do tecido. Embora essa diferença não tenha sido relacionada com nenhum dos parâmetros aqui estudados, clinicamente, essa paciente apresentou recidiva do quadro de hipercortisolismo após retirada total da glândula adrenal esquerda, e parcial da glândula adrenal direita, o que não é muito comum. No entanto, se existe uma relação de causa e efeito entre o padrão celular observado e o guadro clinico apresentado ainda não sabemos, e poderá ser investigado futuramente. Portanto, esses resultados sugerem que mutações no gene ARMC5 não interferem no padrão de distribuição dos tipos celulares nos nódulos. Como a maioria dos nódulos é composta por

células espongiformes e em menor número por células compactas, tivemos como hipótese que as células claras poderiam ser funcionalmente mais ativas, e que poderiam ser estágios funcionais diferentes, ou mesmo estágios de diferenciação de um mesmo tipo celular. Essa possibilidade nos levou a analisar algumas proteínas relacionadas à função dessas células.

6.2 Análise gênica e da expressão das proteínas ARMC5, StAR e das enzimas esteroidogênicas

As mutações no gene ARMC5 tem sido descritas como uma das principais causas do desenvolvimento da PMAH (41-44). Recentemente, Berthon e colaboradores (45) analisaram 4 isoformas de ARMC5 de diferentes tecidos humanos normais, mostrando que apenas sete expressavam todas as isoformas, incluindo a glândula adrenal e o cérebro. Por sua vez, Hu e colaboradores (2017) descreveram (46) que animais knockout para ARMC5 apresentavam comprometimento no processo de proliferação e diferenciação das células T, e aumento de apoptose. Além disso, em animais idosos houve o desenvolvimento de hiperplasia adrenal, mas não de nódulos, sugerindo um papel de ARMC5 na homeostase adrenal. Em nosso trabalho, analisamos a expressão da proteína ARMC5 e confirmamos a localização citoplasmática da proteína em todos os grupos analisados. Através dessa análise não foi possível distinguir diferentes intensidades de marcação nos tipos celulares e nos tecidos com e sem mutação. No entanto, a análise da expressão do gene ARMC5 que comparou amostras de células espongiformes com e sem mutação detectou um aumento da expressão de ARMC5 no tecido de pacientes com mutação. Esses resultados contrastam com aqueles obtidos com culturas de células de PMAH de pacientes (48) que mostraram uma maior expressão do gene ARMC5 em culturas de células de pacientes sem mutação. No entanto, há uma diferença entre o material analisado, uma vez que nas culturas de células temos representados os dois tipos celulares enquanto analisamos somente as células espongiformes. Além disso, parece que a mutação no gene ARMC5 pode estar relacionada com a função da proteína e não somente o quanto a mesma está expressa, como proposto por Assié e colaboradores (47). Nesse mesmo trabalho, foi observado que o silenciamento do ARMC5 em células de carcinoma adrenocortical humano, linhagem H295R, diminui a expressão de CYP17A1 e CYP22A2, e a síntese de cortisol apontando para um papel do gene *ARMC5* na esteroidogênese.

Vários trabalhos (49-52) que analisaram a expressão das enzimas esteroidogênicas em tecidos de PMAH descreveram que a enzima 3βHSD2 é expressa principalmente nas células espongiformes, e a CYP17A1 principalmente nas células compactas. Nossas

análises da expressão proteica dessas enzimas em tecidos de PMAH com e sem mutação confirmam essa expressão diferencial dos tipos celulares. No entanto, a análise da expressão gênica nas células espongiformes não mostrou diferenças significativas entre a expressão dessas enzimas nesse tipo celular. Portanto, a diferença na expressão proteica das células espongiformes pode estar relacionada, por exemplo, com a estabilidade do mRNA, dentre outras possibilidades. Apesar dessa diferença entre os tipos celulares, a análise da expressão da proteína transportadora StAR mostrou que essa proteína ocorre em ambos os tipos celulares, e está expressa com maior intensidade em PMAH de pacientes com mutação no gene ARMC5. Portanto, essa etapa inicial da esteroidogênese, que é de transportar o colesterol para a membrana interna da mitocôndria, parece ser eficiente, independente da mutação no gene ARMC5. No entanto, em conjunto, esses dados sugerem que há uma esteroidogênese ineficiente em pacientes com PMAH, que é independente de mutações no gene ARMC5, apesar dos dados in vitro, sugerirem um papel desse gene na esteroidogênese (47). Como sugerido por Bourdeau e Stratakis (45), o aumento da produção de cortisol parece ocorrer, mais provavelmente, devido à hiperplasia apresentada pela PMAH.

6.3 Análise gênica e da expressão das proteínas dos receptores ectópicos.

Ney e colaboradores (53) sugeriram uma relação funcional entre receptores ectópicos e a esteroidogênese, em estudos in vitro com alguns tumores adrenocorticais benignos e malignos humanos (54-58). No entanto, essa possibilidade adquiriu importância clínica após descrição de três casos de SC dependente do polipeptídio inibitório gástrico (GIP) em pacientes com adenoma unilateral e PMAH. (59-62). Esses achados levaram à hipótese de que outros receptores ectópicos poderiam regular a secreção anormal de cortisol em outros casos de SC. Essa possibilidade tem sido apoiada com relatos de aumento de secreção de cortisol após estimulação com vasopressina em pacientes com carcinoma adrenocortical, adenoma unilateral ou PMAH (63-69). Alguns trabalhos têm demonstrado que, em diversos casos de PMAH, a esteroidogênese pode ser estimulada por outros hormônios que não o ACTH (15,16). Desta forma, atualmente, uma das hipóteses para o desenvolvimento da doença envolve a participação de receptores hormonais eutópicos ou ectópicos aberrantemente expressos no córtex suprarrenal, que inapropriadamente ou ilicitamente estimulariam a esteroidogênese e a hiperplasia nodular da glândula. No entanto, até o momento não foi realizada uma análise da relação entre a presença desses receptores e a presença ou não da mutação no gene ARMC5. Nesse trabalho observamos que o receptor de vasopressina (AVP1AR) está presente em todos os grupos estudados e em ambos os tipos celulares que compõem os nódulos. Além disso, a expressão desse gene é maior nas células espongiformes, com e sem mutação, em relação à adrenal normal. Portanto, esses dados, mostram que, em relação à adrenal normal, esse receptor ativado poderia desencadear a produção de esteroides, no entanto, não há relação com a mutação no gene ARMC5.

O receptor 5HT4 da serotonina também foi associado com a PMAH como apresentado por Lacroix e colaboradores (2009). Alguns estudos mostraram que células da zona glomerulosa de humanos e de ratos tratadas com diferentes concentrações de serotonina foram capazes de produzir e secretar aldosterona (70) e corticosterona (71). Nossos resultados mostraramm que células espongiformes de pacientes com e sem mutação apresentam uma expressão aumentada em relação à adrenal normal. Por outro lado, quando analisamos a expressão proteica desse receptor de serotonina 5HT4 observamos que, pacientes portadores de mutação no gene *ARMC5*, apresentaram uma marcação mais intensa desse receptor em relação aos pacientes sem mutação. Esses resultados sugerem pela primeira vez uma relação entre o receptor 5HT4 e a presença no gene ARMC5 mutação.

N'Diaye e colaboradores (1999) descreveram um aumento do GIPR em nódulos de ambas as adrenais de pacientes diagnosticados com SC (72). Estudos em pacientes com PMAH e SC descreveram uma produção de cortisol aumentada após ingestão de alimentos (64), com liberação de GIP pelas células K do duodeno e do intestino delgado, em concentrações fisiológicas, que se liga ao GIPR ectópico adrenal (18). No entanto, de acordo com Assié e colaboradores (2013) não foram descritos até o momento pacientes portadores de mutações no gene *ARMC5* e aumento da produção de cortisol em resposta à ingestão de alimento. Porém, como observado por Swords e colaboradores (73), na descrição de um caso, a expressão aberrante do mRNA do GIPR não foi suficiente para desencadear SC dependente de alimento. Neste trabalho mostramos nos diferentes grupos estudados diferentes níveis de expressão de mRNA de GIPR, no entanto, não detectamos a proteína GIPR nos diferentes tecidos de pacientes com PMAH.

6.4 Análise da expressão do ACTH ectópico

Ehrhart-Bornstein e colaboradores (1998) descreveram uma interação intraadrenal na regulação da esteroidogênese adrenocortical. Pereira e colaboradores (75) mostraram que os nódulos de PMAH expressavam ACTH, reforçando a possibilidade dessa interação intraadrenal através de uma regulação parácrina do ACTH na produção de esteroides. Recentemente, Louiset e colaboradores (76), confirmaram uma produção ectópica de ACTH nos nódulos da PMAH, com provável ação autócrina e parácrina, que poderia desencadear a cascata esteroidogênica e a produção de cortisol. Além disso, a expressão anormal de ACTH por algumas células dos nódulos de PMAH poderiam representar um fisiopatológico secundário relacionado às mutacões observadas processo no desenvolvimento da PMAH. Em razão disto, analisamos a presença da expressão do ACTH nos diferentes grupos de pacientes. Apesar de confirmarmos a presença ectópica do ACTH nos nódulos de PMAH, não observamos relação dessa expressão e a presença ou não da mutação no gene ARMC5, sugerindo que essa mutação pode não ter influência na presença do ACTH ectópico.

6.5 Análise da capacidade proliferativa através da expressão da proteína PCNA

Não há descrição na literatura sobre a capacidade proliferativa das células que compõem os macronódulos da PMAH, bem como a diferença entre células compactas e espongiformes com relação à proliferação. Para essa análise investigamos o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que é uma proteína nuclear não-histona associada à atividade proliferativa, sintetizada durante a interfase e que desaparece no final da mitose (25). Observamos que através da análise do PCNA ambos os tipos celulares apresentaramm a mesma capacidade de proliferação. Em contraste, Zhang e colaboradores (77) descreveram, utilizando parâmetros que analisam atipias nucleares em diferentes alterações tumorais adrenais, que as células compactas apresentavam áreas nucleares ligeiramente diminuídas, sugerindo que essas células pudessem ser metabolicamente quiescentes. Esses resultados dão suporte à possibilidade de que células compactas são menos "funcionais", tanto do ponto de vista da função esteroidogência quanto da capacidade proliferativa.

7. Conclusão

Como conclusão, da análise morfológica e funcional das adrenais de pacientes diagnosticados com PMAH, portadores ou não de mutações no gene *ARMC5*, temos que:

- Os nódulos de PMAH são compostos majoritariamente de células espongiformes, independente da presença e do tipo de mutação.
- A mutação no gene ARMC5 não parece estar relacionada com a expressão da proteína StAR, e das enzimas esteroidogênicas 3βHSD2 e CYP17A1.
- Os níveis de mRNA dos receptores ectópicos estão aumentados em adrenal de pacientes com PMAH, independente da presença de mutação.
- Pode haver uma relação entre a presença do receptor de serotonina 5HT4 em pacientes de PMAH e a mutação no gene *ARMC5*.
- O ACTH ectópico detectado nas adrenais de pacientes com PMAH ocorre independentemente da presença de mutação no gene *ARMC5*.
- Células espongiformes e compactas apresentam o mesmo potencial de proliferação, que independe da mutação no gene *ARMC5*.

8.Referências

- 1. Junqueira, L.C.U.; Carneiro, J. Histologia básica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004
- Orth,D. N; Kovascw. J. The adrenal córtex. In Wilson , J. D; Foster, D. J; Kronenberg, H. M; Larsen, P.R; Willians textbook of endrocrinology. 9th ed.Philadelphia Saunders Book Company, 1998. p. 517-664
- 3. Write, A.; Gibson, S. ACTH precursors: biological significance and clinical relevance. Clin. Endocrinol. (Oxf.), v. 48, n.3, p.251-255, 1998
- Aguilera G. Regulation of Pituitary Acth-Secretion during Chronic Stress. Front Neuroendocrin. 1994;15(4):321-50.
- Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(12):5593-602.
- Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. Lancet 2006; 362:1605–1617.
- Kirschner MA, Powell RD, Lipsett MB. Cushing's Syndrome: Nodular Cortical Hyperplasia of Adrenal Glands With Clinical and Pathological Features Suggesting Adrenocortical Tumor. J Clin Endocrinol Metab. 1964;24:947-55.
- Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. The lancet. 2015 Aug 29;386(9996):913-27.
- Lacroix A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2009;23(2):245-59.
- Antonini SR, Fragoso MC, Lacroix A. [Clinical and molecular aspects of the ACTHindependent bilateral macronodular adrenal hyperplasia]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(5):620-36
- 11. Bourdeau I, Stratakis CA. Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. Ann N Y Acad Sci. 2002;968:240-55.
- Sasano H, Suzuki T, Nagura H. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes. Mod Pathol. 1994;7(2):215-9.
- 13. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocrine Reviews. 1988 Aug 1;9(3):295-318.

- 14. Schorr I, Ney RL. Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl cyclase. J Clin Invest 1971;50(6):1295-300.
- 15. Lacroix A, Tremblay J, Rousseau G, Bouvier M, Hamet P. Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. N Engl J Med 1997 337:1429–1434
- 16. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, Raynaud G, Verhofstad AA, Wolf LM, Vaudry H Serotonin- induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin4 receptor subtype. Neuroscience 1992 47:999–1007
- Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2004 Oct 1;15(8):375-82.
- 18. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, et al. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion – a new cause of Cushing's syndrome. N Engl J Med 1992;327(14):974-80.
- Thibonnier M, Auzan C, Madhun Z, Wilkins P, Berti-Mattera L, Clauser E. Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptors. J Biol Chem. 1994 269:3304–3310.
- 20. Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, et al. Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. Nature. 1992 357:333–335.
- 21. De Keyzer Y, Auzan C, Lenne F, et al. Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor. FEBS Lett . 1994 356:215–220.
- 22. Payet N, Deziel Y, Lehoux JG. Vasopressin: a potent growth factor in adrenal glomerulosa cells in culture. J Steroid Biochem . 1984 20:449–454.
- Brooks VL, Blakemore LJ. Vasopressin: a regulator of adrenal glucocorticoid production? Am J Physiol. 1989 256:E566–E572.
- 24. Larcher A, Delarue C, Idres S, et al. Identification of vasotocin-like immunoreactivity in chromaffin cells of the frog adrenal gland: effect of vasotocin on corticosteroid secretion. Endocrinology . 1989 125:2691–2700.
- 25. Bird IM, Nicol M, Williams BC, Walker SW. Vasopressin stimulates cortisol secretion and phosphoinositide catabolism in cultured bovine adrenal fasciculata/reticularis cells. J Mol Endocrinol . 1990 5:109–116.

- 26. Perraudin V, Delarue C, Lefèbvre H, Contesse V, Kuhn J-M, Vaudry, H. Vasopressin stimulates cortisol secretion from human adrenocortical tissue through activation of V1 receptors. J Clin Endocrinol Metab . 1993 76:1522–1528.
- 27. Andre Lacroix, Johanne Tremblay, Rhian M. Touyz, Li Yuan Deng, Richard Lariviere, Jean R. Cusson, Ernesto L. Schiffrin, Pavel Hamet; Abnormal Adrenal and Vascular Responses to Vasopressin Mediated by a V1-Vasopressin Receptor in a Patient with Adrenocorticotropin-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia, Cushing's Syndrome, and Orthostatic Hypotension. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82 (8): 2414-2422. doi: 10.1210/jcem.82.8.4140
- 28. Nieman L, Cutler Jr GB. Cushing's syndrome. In: De Groot LJ, ed. Endocrinology. Philadelphia: Saunders; 1995 1741–1770.
- 29. Bourdeau I, D'amour P, Hamet P, Boutin JM, Lacroix A. Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2001 Nov 1;86(11):5534-40.)
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Vaudry, H., & Kuhn, J. M.. Serotonergic regulation of adrenocortical function. Hormone and metabolic research, 1998 30(06/07), 398-403
- 31. Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Feuilloley, M., Hery, F., Grise, P., ... & Vaudry, H. Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin4 receptor subtype. Neuroscience, 1992 47(4), 999-1007.
- Assié, G., Libé, R., Espiard, S., Rizk-Rabin, M., Guimier, A., Luscap, W., ... & Rodriguez,
 S. ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2013 *369*(22), 2105-2114.
- 33. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, Szarek E, Trivellin G, Sinaii N, Berthon A, Libé R, Assié G, Espiard S, Drougat L. Macronodular adrenal hyperplasia due to mutations in an armadillo repeat containing 5 (ARMC5) gene: a clinical and genetic investigation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2014 Jun 1;99(6):E1113-9.
- 34. Alencar GA, Lerario AM, Nishi MY, Mariani BM, Almeida MQ, Tremblay J, Hamet P, Bourdeau I, Zerbini MC, Pereira MA, Gomes GC. ARMC5 mutations are a frequent cause of primary macronodular adrenal Hyperplasia. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2014 Aug 1;99(8):E1501-9.

- 35. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, Szarek E, Trivellin G, Sinaii N, et al. Macronodular Adrenal Hyperplasia due to Mutations in an Armadillo Repeat Containing 5 (ARMC5) Gene: A Clinical and Genetic Investigation. J Clin Endocrinol Metab. 2014;jc20134280
- 36. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. Endocr Rev. 2001;22(1):75-110.
- 37. Knudson, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2001 *1*(2), 157.
- 38. Slooten HV, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. Cancer. 1985 Feb 15;55(4):766-73.
- 39. Dobbie JW. Adrenocortical nodular hyperplasia: the ageing adrenal. The Journal of pathology. 1969 Sep;99(1):1-8./
- 40.Bisi H, Ruggeri GB, Alves VAF, Kanamura CT, Longatto A, Yamada F, et al. Morphological and immunohistochemical studies of normal adrenal gland. Braz J Morphol Sci 1999;16:33-8.)
- 41. Fragoso MC, Alencar GA, Lerario AM, Bourdeau I, Almeida MQ, Mendonca BB, Lacroix
 A. Genetics of primary macronodular adrenal hyperplasia. Journal of Endocrinology.
 2015 Jan 1;224(1):R31-43.
- 42. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, Szarek E, Trivellin G, Sinaii N, Berthon A, Libé R, Assié G, Espiard S, Drougat L. Macronodular adrenal hyperplasia due to mutations in an armadillo repeat containing 5 (ARMC5) gene: a clinical and genetic investigation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2014 Jun 1;99(6):E1113-9.
- 43. Gagliardi L, Schreiber AW, Hahn CN, Feng J, Cranston T, Boon H, Hotu C, Oftedal BE, Cutfield R, Adelson DL, Braund WJ. ARMC5 mutations are common in familial bilateral macronodular adrenal hyperplasia. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2014 Sep 1;99(9):E1784-92.
- 44. Espiard S, Drougat L, Libé R, Assié G, Perlemoine K, Guignat L, Barrande G, Brucker-Davis F, Doullay F, Lopez S, Sonnet E. ARMC5 mutations in a large cohort of primary macronodular adrenal hyperplasia: clinical and functional consequences. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2015 Jun 1;100(6):E926-35.Berthon A, Faucz F, Bertherat J, Stratakis CA. Analysis of ARMC5 expression in human tissues. Molecular and cellular endocrinology. 2017 Feb 5;441:140-5.
- 45. Hu, Y., Lao, L., Mao, J., Jin, W., Luo, H., Charpentier, T., ... & Lamarre, A. Armc5 deletion causes developmental defects and compromises T-cell immune responses. *Nature communications*, 2017, *8*, 13834.

- 46. Assié G, Libé R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscap W, et al. ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. N Engl J Med. 2013;369(22):2105-14.
- 47. Cavalcante IP, Nishi M, Zerbini MC, Almeida MQ, Brondani VB, de Arruda Botelho ML, Tanno FY, Srougi V, Chambo JL, Mendonca BB, Bertherat J. The role of ARMC5 in human cell cultures from nodules of primary macronodular adrenocortical hyperplasia (PMAH). Molecular and cellular endocrinology. 2018 Jan 15;460:36-46.
- 48. Koizumi S, Beniko M, Ikota A, et al. Adrenocorticotropic hormone-independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia: a case report and immunohistochemical studies. Endocr J 1994;41(4):429–35.
- 49. Wada N, Kubo M, Kijima H, Ishizuka T, Saeki T, Koike T, Sasano H. Adrenocorticotropinindependent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical studies of steroidogenic enzymes and post-operative course in two men. European journal of endocrinology. 1996 May 1;134(5):583-7.
- 50. Morioka M, Ohashi Y, Watanabe H, Komatsu F, Jin TX, Suyama B, Tanaka H. ACTH-Independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia (AIMAH). Endocrine journal. 1997;44(1):65-72
- 51. Sasano H, Suzuki T, Nagura H. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes. Mod Pathol 1994;7:215-9
- 52. Schorr I, Ney RL. 1971 Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenylyl cyclase. *J Clin Invest*. 50:1296–1300./ Hingshaw HT, Ney RL. Abnormal control in the neoplastic adrenal cortex. In: McKerns KW,ed. Hormones and cancer. New York: Academic Press; 1974, 309–327
- 53. Williams LT, Gore TB, Lefkowitz RJ. Ectopicβ -adrenergic receptor binding sites. *J Clin Invest*. 1977, 59:319–324. /
- 54. Millington DS, Golder MP, Cowley T, London D, Roberts H, Butt WR, Griffiths K. In vitro synthesis of steroids by a feminising adrenocortical carcinoma: effect of prolactin and other protein hormones. Acta endocrinologica. 1976 Jun 1;82(2):561-71./
- 55. Mircescu H, Jilwan J, N' Diaye N, Bourdeau I, Tremblay J, Hamet P, Lacroix A. Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome?. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000 Oct 1;85(10):3531-6./

- 56. Hirata Y, Uchihashi M, Sueoka S, Matsukura S, Fujita T. Presence of ectopic βadrenergic receptors on human adrenocortical cortisol-producing adenomas. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1981 Nov 1;53(5):953-7.
- 57. Katz MS, Kelly TM, Dax EM, Pineyro MA, Patilla JS, Gregerman RI. Ectopic β-adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase in human adrenocortical carcinomas. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1985 May 1;60(5):900-9.
- 58. Leinonen P, Ranta T, Slegberg R, Pelkonen R, Heikkilä P, Kahri A. Testosteronesecreting virilizing adrenal adenoma with human chorionic gonadotrophin receptors and 21-hydroxylase deficiency. Clinical endocrinology. 1991 Jan;34(1):31-5./ Willenberg HS, Stratakis CA, Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Chrousos GP, Bornstein SR. Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. New England Journal of Medicine. 1998 Jul 2;339(1):27-31.
- 59. Hamet P, Larochelle P, Franks DJ, Cartier P, Bolte E. Cushing syndrome with fooddependent periodic hormonogenesis. Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale. 1987 Nov;10(6):530-3.
- Lacroix A, Bolté E, Tremblay J, Dupré J, Poitras P, Fournier H, Garon J, Garrel D, Bayard F, Taillefer R, Flanagan RJ. Gastric Inhibitory Polypeptide–Dependent Cortisol Hypersecretion—A New Cause of Cushing's Syndrome. New England Journal of Medicine. 1992 Oct 1;327(14):974-80.
- 61. Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, Lebrethon MC, Budi I, Balliere AM, Mahoudeau J. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. New England Journal of Medicine. 1992 Oct 1;327(14):981-6.)
- 62. Perraudin VE, Delarue CA, De Keyzer YV, Bertagna X, Kuhn JM, Contesse V, Clauser E, Vaudry H. Vasopressin-responsive adrenocortical tumor in a mild Cushing's syndrome: in vivo and in vitro studies. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1995 Sep 1;80(9):2661-7.
- 63. Horiba NO, Suda TO, Aiba MO, Naruse MI, Nomura KA, Imamura MA, Demura HI. Lysine vasopressin stimulation of cortisol secretion in patients with adrenocorticotropinindependent macronodular adrenal hyperplasia. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1995 Aug 1;80(8):2336-41.
- 64. Lacroix A, Tremblay J, Touyz RM, Deng LY, Lariviere R, Cusson JR, Schiffrin EL, Hamet P. Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V1-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular

adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and orthostatic hypotension. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1997 Aug 1;82(8):2414-22.

- 65. lida K, Kaji H, Matsumoto H, Okimura Y, Abe H, Fujisawa M, Kamidono S, Chihara K. Adrenocorticotrophin-independent macronodular adrenal hyperplasia in a patient with lysine vasopressin responsiveness but insensitivity to gastric inhibitory polypeptide. Clinical endocrinology. 1997 Dec;47(6):739-45.
- 66. Arnaldi G, Gasc JM, de Keyzer Y, Raffin-Sanson ML, Perraudin V, Kuhn JM, Raux-Demay MC, Luton JP, Clauser E, Bertagna X. Variable expression of the V1 vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1998 Jun 1;83(6):2029-35.)
- 67. Miyachil, K., Fritzler, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a nuclear anting in proliferating cells. J. Immunol., v. 121, n. 6, p. 2228-34, 1978.
- 68. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, et al. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion a new cause of Cushing's syndrome. N Engl J Med 1992;327(14):974-80. / Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, et al. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. N Engl J Med 1992;327 (14):981-6.
- 69. Shenker Y., Gross M. D. and Grekin R. J. Central serotonergic stimulation of aldosterone secretion. J. clin.Invest. 1985 76, 1485-1490.
- 70. Racz K., Wolf I., Kiss R., Lada G., Vida S. and Glaz E. Corticosteroidogenesis by isolated human adrenal cells:effect of serotonin and serotonin antagonists. Experientia1979 35, 1532-1534
- 71. N'diaye N, Hamet P, Tremblay J, Boutin JM, Gaboury L, Lacroix A. Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptidedependent Cushing's syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1999 Aug 1;84(8):2616-22.
- 72. Swords, F. M., Aylwin, S., Perry, L., Arola, J., Grossman, A. B., Monson, J. P., & Clark, A. J. L. The aberrant expression of the gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor in adrenal hyperplasia: does chronic adrenocorticotropin exposure stimulate up-regulation of GIP receptors in Cushing's disease. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2005 90(5), 3009-3016.
- 73. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. Endocrine reviews. 1998 Apr 1;19(2):101-43.

- 74. Pereira MA, Araújo RS, Bisi H. Síndrome de Cushing associada à hiperplasia macronodular das adrenais: apresentação de um caso e revisão da literatura. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 2001 Dec;45(6):619-27.
- 75. Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, et al. Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. N Engl J Med. 2013;369(22):2115-25.
- 76. Zhang Q, Dou J, Gu W, Yang G, Mu Y, Lu J. In Silico Analyses Reveals Nuclear Asymmetry of Spongiocytes and Compact Cells of Adrenocorticotrophic Hormone-Independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia. The American journal of the medical sciences. 2014 May 1;347(5):400-5.