Beatriz Marinho de Paula Mariani

**Análise de variantes alélicas no gene *Armadillo Repeat Containing 5*
(*ARMC5*) em pacientes com incidentaloma da suprarrenal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Candida Barisson
Villares Fragoso

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mariani, Beatriz Marinho de Paula
Análise de variantes alélicas no gene Armadillo
Repeat Containing 5 (ARMC5) em pacientes com
incidentaloma da suprarrenal / Beatriz Marinho de
Paula Mariani. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Maria Candida Barisson Villares
Fragoso.

Descritores: 1.Glândulas suprarrenais 2.Mutação
3.Achados incidentais 4.Gene ARMC5 5.PMAH
6.Polimorfismo genético

USP/FM/DBD-166/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 2015/06146-2.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Isabel Marinho de Paula, por acreditar em mim, me incentivar, me mostrar o verdadeiro significado do amor e ser a base de toda a minha vida. Sem ela, nada seria possível.

Ao meu pai, Valter Mariani, por ser meu grande mestre. Alguém que tenho muito orgulho de chamar de pai.

Ao meu irmão, Rafael Marinho de Paula, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos, por me amarem e respeitarem todos os dias da minha vida.

Aos pacientes, por fazerem todo o estudo possível.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Apresento agora meus agradecimentos aos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese:

Prof^a. Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

Prof^a. Dra. Berenice Bilharinho Mendonça

Prof^a. Dra. Ana Claudia Latronico

Cristina Rossi

Ericka B. Trarbach

Francinilda S. P. Oliveira

Ingrid Quevedo Wanich

Mirian Y. Nishi

Rosangele P. Zamboni Santos

Sorahia Domenice

À todos do LIM 42

Normatização Adotada

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Summary

1.0 INTRODUÇÃO	01
1.1 Incidentalomas da suprarrenal	01
1.2 Hiperplasia suprarrenal macronodular primária	02
1.3 Aspectos clínicos e laboratoriais da PMAH	03
1.4 Hiper cortisolismo subclínico	05
1.5 PMAH em meningiomas do sistema nervoso central	06
1.6 Características radiológicas da PMAH	06
1.7 Anatomo patológico da PMAH	08
1.8 Mecanismos moleculares envolvidos na PMAH	11
1.9 O gene e a proteína Armadillo Repeat Containing 5 (ARMC5)	15
2.0 JUSTIFICATIVA	19
3.0 OBJETIVOS	20
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Casuísticas	21
4.2 Avaliação por imagem radiológica (TC)	21
4.3 Diagnóstico patológico	22
4.4 Extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico	22
4.5 Extração de DNA de tecido fresco ou congelado	23

4.6 Análise molecular	23
5.0 RESULTADOS	27
5.1 Gene <i>ARMC5</i>	27
5.2 Autonomia da secreção do cortisol de acordo com o DST.....	35
6.0 DISCUSSÃO	43
7.0 CONCLUSÃO	47
8.0 ANEXOS	48
8.1 Artigos publicados durante a realização da tese.....	49
8.2 Apresentação de trabalho oral – COPEM 2017.....	51
9.0 REFERÊNCIAS	52

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ARMC5 – Armadillo Repeat Containing 5

PMAH - Hiperplasia Suprarrenal Macronodular Primária

SC – Síndrome de Cushing

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

MC2R – Melanocortin 2 receptor

SNC - Sistema Nervoso Central

TC - Tomografia computadorizada

RM – Ressonância magnética

PET - Tomografia por emissão de pósitrons

18F-FDG - Tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose marcada

18F-FDG-PET/CT - Tomografia por emissão de pósitrons com fluordesoxiglicose marcada acoplada à tomografia computadorizada

SUV - Valor padrão de captação máxima

H295R - Células da linhagem de carcinoma adrenocortical humana

CTNNB1 – Gene que codifica a β -catenina

GNAS – Subunidade alfa estimulatória da proteína G

CYP17A1 - 17 α -hidroxilase/17,20-liase

DST – Teste de supressão com 1mg dexametasona

V.O – Via Oral

SCS – Síndrome de Cushing subclínica

HHS – Hipotálamo-hipófise-suprarrenal

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

dNTP – Desoxirribonucleotídeo

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fotografia da peça cirúrgica retirada de uma paciente com PMAH familiar e síndrome de Cushing clássica, aonde observa-se em (A) o aumento da glândula suprarrenal (seta maior) e a presença nódulos de coloração amarelada, com um dos nódulos isolado (seta menor); (B) Fotomicrografia de uma secção do tecido de uma hiperplasia suprarrenal macronodular, onde observa-se células de citoplasma claro grandes (ricas em lipídios), dispostas em cordões, e células de citoplasma compacto (pobres em lipídios), dispostas em estruturas semelhantes a “ninhos” ou “ilhas”.....pg. 09

Figura 2 Fotomicrografia de uma secção do tecido de uma hiperplasia suprarrenal macronodular, com imunoistoquímica para ACTH dos nódulos da PMAH. (A) Marcação do ACTH em *cluster*. (B) Marcação do ACTH difusa.....pg. 10

Figura 3 Gráfico representando a comparação das concentrações do ACTH no cateterismo das veias suprarrenais e na periferia de pacientes com PMAH e com hiperaldosteronismo primário. As concentrações de ACTH das suprarrenais dos pacientes com PMAH são extremamente elevadas quando comparadas com as da periferia, em contraste, nos pacientes com aldosteronoma as concentrações de ACTH são semelhantes, tanto na periferia quanto nas veias suprarrenais, corroborando com a hipótese da produção ectópica intrasuprarrenal de ACTH..... pg. 11

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação etiológica da síndrome de Cushing endógena	pg. 02
Tabela 2 – Diferentes designações da mesma doença ao longo do tempo	pg. 03
Tabela 3 – Dados hormonais e características do exame radiológico de uma família brasileira com PMAH	pg. 05
Tabela 4 – Número de famílias descritas de 1993 a 2015	pg. 13
Tabela 5 – <i>Primers</i> utilizados para amplificação da região codificadora do gene <i>ARMC5</i>	pg. 25
Tabela 6 – <i>Primers</i> utilizados para amplificação da região codificadora do gene <i>ARMC5</i> em tecidos conservados em emblocados de parafina	pg. 26
Tabela 7 – Análise germinativa das variantes alélicas do <i>ARMC5</i> dos 74 pacientes com nódulos suprarrenais unilaterais incidentais	pg. 28
Tabela 8 – Análise germinativa das variantes alélicas do <i>ARMC5</i> dos 13 pacientes index com síndrome de Cushing e nódulos suprarrenais bilaterais	pg. 32
Tabela 9 – Análise germinativa das variantes alélicas do <i>ARMC5</i> das 6 famílias não relacionadas com 10 membros rastreados e carreadores da mutação do <i>ARMC5</i>	pg. 34
Tabela 10 – Dados hormonais e radiológicos dos 74 pacientes com nódulos suprarrenais unilaterais incidentais	pg. 36
Tabela 11 – Dados hormonais e radiológicos dos 7 casos index considerados PMAH familiar	pg. 40
Tabela 12 – Análise germinativa das variantes alélicas do <i>ARMC5</i> dos 11 membros rastreados de 7 famílias não relacionadas e carreadoras da mutação do <i>ARMC5</i>	pg. 41
Tabela 13 – Análise germinativa das variantes alélicas do <i>ARMC5</i> dos 7 membros não relacionados, considerados aparentemente esporádicos e carreadores da mutação do <i>ARMC5</i>	pg. 42

Lista de anexos

8.1 Artigos publicados durante a realização da tese

The Role of *gsp* Mutations on the Development of Adrenocortical Tumors and Adrenal Hyperplasia

Maria Candida Barisson Villares Fragoso*, Ingrid Quevedo Wanichi,
Isadora Pontes Cavalcante and Beatriz Marinho de Paula Mariani

Unidade de Suprarrenal, Disciplina de Endocrinologia e Metabolismo, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular
LIM/42, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

André Lacroix,

University of Montreal, Canada

Reviewed by:

Tullio Florio,

University of Genoa, Italy

Rafael Vazquez-Martinez,

University of Córdoba, Spain

*Correspondence:

Maria Candida Barisson

Villares Fragoso

maria.villares@hc.fm.usp.br

Specialty section:

This article was submitted to

Neuroendocrine Science,

published: 27 July 2016

Somatic *GNAS* point mutations, commonly known as *gsp* mutations, are involved in the pathogenesis of McCune–Albright syndrome (MAS) and have also been described in autonomous hormone-producing tumors, such as somatotropinoma, corticotrophoma, thyroid cancer, ovarian and testicular Leydig cell tumors, and primary macronodular adrenocortical hyperplasia (PMAH) (1–3). The involvement of *gsp* mutations in adrenal tumors was first described by Lyons et al. Since then, several studies have detected the presence of *gsp* mutations in adrenal tumors, but none of them could explain its presence along or the mechanism that leads to tumor formation and hormone hypersecretion. As a result, the molecular pathogenesis of the majority of sporadic adrenocortical tumors remains unclear (3). PMAH has also been reported with *gsp* somatic mutations in a few et al. identified two distinct *gsp* somatic mutations affecting arginine residues on codon 201 of *GNAS* in a few patients with PMAH who lacked any features or manifestations of MAS. Followed by this discovery, other studies have continued looking for *gsp* mutations based on strong prior evidence demonstrating that increased cAMP signaling is sufficient for cell proliferation and cortisol production (2, 4). With consideration for the previously reported findings, we conjecture that although somatic activating mutations in *GNAS* are a rare molecular event, these mutations could probably be sufficient to induce the development of macronodule hyperplasia and variable cortisol secretion. In this manuscript, we revised the presence of *gsp* mutations associated with adrenal cortical tumors and hyperplasia.

Targeted assessment of *G0S2* methylation identifies a rapidly recurrent, routinely fatal molecular subtype of adrenocortical carcinoma

Dipika R. Mohan^{1,2,15}, Antonio Marcondes Lerario^{3,4,15}, Tobias Else³, Bhramar Mukherjee^{5,6}, Madson Q. Almeida^{4,7}, Michelle Vinco⁸, Juilee Rege⁹, Beatriz M. P. Mariani⁴, Maria Claudia N. Zerbini¹⁰, Berenice B. Mendonca¹¹, Ana Claudia Latronico¹¹, Suely K. N. Marie¹², William E. Rainey⁹, Thomas J. Giordano^{3,8,13}, Maria Candida B. V. Fragoso^{4,7,16}, and Gary D. Hammer^{3,9,13,14,16}

University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA: ¹Medical Scientist Training Program; ²Doctoral Program in Cancer Biology; ³Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology, and Diabetes; ⁵Department of Biostatistics; ⁶Department of Epidemiology; ⁸Department of Pathology; ⁹Department of Molecular and Integrative Physiology; ¹³University of Michigan Rogel Cancer Center; ¹⁴Department of Cell & Developmental Biology

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil: ⁴Unidade de Suprarrenal, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia; ⁷Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP, Hospital das Clínicas; ¹⁰Departamento de Patologia; ¹¹Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia; ¹²Laboratório de Biologia Molecular e Celular/LIM15, Departamento de Neurologia

¹⁵Co-first author, ¹⁶Co-senior author

Running title: *G0S2* methylation predicts rapid recurrence and death in ACC

8.2 Apresentação de trabalho oral – COPEM 2017

Papel do *ARMC5* em culturas de células de Hiperplasia Macronodular Adrenocortical Primária (PMAH)

Cavalcante, IP¹, Nishi M², Zerbini MCN³, **Mariani BMP²**, Chambo JL⁴, Almeida MQ^{2,5},
Lotfi CFP^{1*}, Fragoso MCBV^{2,5*}

¹Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia da USP

²Laboratório de Investigação Médica LIM/42 HCFMUSP

³Departamento de Patologia ⁴Departamento de Urologia HCFMUSP

⁵Unidade de Suprarrenal, Disciplina de Endocrinologia & Metabolgia da FMUSP

**Os autores contribuíram igualmente para a realização deste trabalho.*

12º Congresso Paulista de Endocrinologia e Metabolgia COPEM – Brasil, SP
2017

Resumo

RESUMO

Mariani BMP. Análise de Variantes Alélicas no gene armadillo repeat containing 5 (ARMC5) em Pacientes com Incidentaloma da Suprarrenal [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A hiperplasia suprarrenal macronodular primária (PMAH) foi descrita em 1964 por Kirschner e cols, sendo considerada uma causa rara da síndrome de Cushing (SC) endógena ACTH-independente, geralmente associada a nódulos suprarrenais bilaterais. A apresentação clínica dos pacientes é heterogênea, variando desde subclínica até uma síndrome de Cushing clássica, com todos os seus comemorativos. O padrão de secreção do cortisol após o teste de supressão com 1 mg de dexametasona *overnight* nestes pacientes, identifica a intensidade da autonomia da secreção do cortisol, ou seja, as concentrações de cortisol sérico acima de 1.8 ug/dL e até 5 ug/dL, caracterizam uma *possível* secreção autônoma do cortisol e acima deste valor (5 ug /dL) uma secreção *autônoma* do cortisol. Os pacientes são geralmente diagnosticados com PMAH quando submetidos à investigação de hipercortisolismo endógeno ACTH-independente ou mais frequentemente durante a investigação de incidentalomas bilaterais da suprarrenal e menos provavelmente em pacientes com síndrome metabólica associada a meningiomas do sistema nervoso central, uma vez que estes são muito prevalentes em pacientes com PMAH. O acometimento bilateral das suprarrenais acrescido da descrição na literatura de várias famílias com membros acometidos pela PMAH já indicava uma causa genética envolvida na fisiopatologia desta intrigante doença. Em 2013, dois estudos, um Brasileiro e um Frances, usando metodologias distintas identificaram mutações germinativas no *ARMC5* como a principal causa genética da PMAH. A maior genealogia publicada até hoje foi a de uma família Brasileira, com 5 gerações nas quais

identificamos 16 pacientes carreadores da mutação, a partir de dois irmãos inicialmente investigados. Aproximadamente 30% dos membros afetados desta genealogia, apresentavam somente uma suprarrenal acometida e a suprarrenal contra-lateral absolutamente normal ou discretamente espessada. Esta observação nos infere que a hiperplasia macronodular da PMAH pode ocorrer de forma assincrônica e dificultar aprincipio o seu diagnostico. A incidência de nódulos unilaterais identificados em exame de imagens na pratica clinica é muito elevada (1,4 – 2,9%, podendo chegar a 10% em pacientes com idade a cima de 70 anos) os denominados incidentalomas suprarrenais. Além disso, a grande maioria dos pacientes com nódulos suprarrenais apresentam alguma autonomia da secreção do cortisol. Considerando estes aspectos, nos propomos a investigar se os incidentalomas suprarrenais unilaterais com alguma autonomia da secreção do cortisol poderiam fazer parte do espectro de apresentação da PMAH. Nosso trabalho tem como foco analisar a frequência das variantes alélicas do *ARMC5* em uma coorte multicêntrica de pacientes com nódulos suprarrenais incidentais e autonomia da secreção do cortisol. O esclarecimento da frequência da PMAH pode nos direcionar a uma melhor pratica clinica e cuidados com os pacientes.

SUMMARY

Mariani BMP. Analysis of the allelic variants of the armadillo repeat containing 5 (*ARMC5*) *gene* in patients with adrenal incidentalomas [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Primary macronodular adrenal hyperplasia (PMAH) was described in 1964 by Kirschner et al, and is considered a rare cause of endogenous ACTH-independent Cushing's syndrome (CS), usually associated with bilateral adrenal nodules. The clinical presentation of the patients is heterogeneous, ranging from subclinical to overt Cushing's syndrome, with all its characteristics. The cortisol secretion pattern, after the 1 mg dexamethasone overnight suppression test, identifies the intensity of cortisol secretion autonomy, ie, serum cortisol concentrations above 1.8 ug / dL and up to 5 ug / dL , characterize a possible autonomous cortisol secretion and above this value (5 ug / dL) an autonomous cortisol secretion. Patients are generally diagnosed with PMAH when undergoing ACTH-independent endogenous hypercortisolism investigation or, more frequently, during the investigation of bilateral adrenal incidentalomas and less likely in patients with metabolic syndrome associated with meningiomas of the central nervous system, since these are very prevalence in patients with PMAH. Bilateral adrenal involvement, along with the description in the literature of several PMAH-affected family relatives, has already indicated a genetic cause involved in the pathophysiology of this intriguing disease. In 2013, two studies, one Brazilian and one Franch, using distinct methodologies, identified germline mutations in *ARMC5* as the major genetic cause of PMAH. The largest genealogy published so far was that of a Brazilian family, with 5 generations in which we identified 16 patients, carriers of the mutation, from two siblings initially investigated. Approximately 30% of the affected members of this genealogy had only one adrenal affected with the contralateral gland absolutely normal or discretely thickened. This observation infers us that the macronodular hyperplasia of PMAH can occur in an asynchronous way and make it difficult to diagnose it. The incidence of unilateral nodules identified in clinical imaging is very high (1.4-2.9%, and may reach 10% in patients over the age of 70), the so-called adrenal incidentalomas. In addition, the vast majority of patients with adrenal nodules have some autonomy in cortisol secretion. Considering these aspects, we propose to investigate whether unilateral adrenal incidentalomas, with some autonomy of cortisol

secretion, could be part of the presentation spectrum of PMAH. Our work focuses on the frequency of allelic variants of ARMC5 in a multicentric cohort of patients with incidental adrenal nodules and autonomy of cortisol secretion. Clarifying the frequency of PMAH may lead to better clinical practice and patient care.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Incidentalomas da suprarrenal

Incidentalomas da suprarrenal (IS) são definidos como uma massa/nódulo ou lesão localizados na topografia das suprarrenais (> de 1 cm), identificados por meio de exames de imagem radiológica realizados por outras razões não relacionadas à doença da suprarrenal. Lesões suprarrenais detectadas em exames de imagem solicitados aos pacientes com câncer ou síndromes hereditárias estão fora dessa definição (1).

Os IS são reconhecidos como um problema de saúde pública, atingindo uma prevalência de 5% na população geral e 10% na população idosa. Havendo uma maior prevalência dos IS em pacientes com obesidade, diabetes ou hipertensão (2).

Embora a maioria dos IS seja unilateral, os IS bilaterais são encontrados em até 15% deles. Assim, a prevalência dos IS bilaterais pode ser estimada em torno de 0,3% a 0,6% dos exames na população geral (3).

A maioria dos IS (~85%) são lesões benignas, sem nenhuma produção hormonal. Um menor percentual dos IS (15%) é caracterizado como lesões malignas e podem apresentar alguma secreção hormonal (glicocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, catecolaminas). A principal produção hormonal dos IS é o cortisol (1-3).

A etiologia dos IS difere quanto a sua apresentação uni ou bilateral. Estudos realizados por Nawar R e cols. e Bourdeau I e cols. descreveram que as causas mais prevalentes dos IS bilaterais foram: adenomas e feocromocitomas bilaterais e a PMAH (3,4).

1.2 Hiperplasia suprarrenal macronodular primária

A Hiperplasia Suprarrenal Macronodular Primária (PMAH) é considerada uma causa rara de síndrome de Cushing (SC) e estima-se que represente menos de 2% dos casos de SC ACTH-independente (6,7). Descrita pela primeira vez em 1964 por Kirschner e cols. (8), caracteriza-se geralmente pela presença de macronódulos funcionantes, em ambas as suprarrenais, e por uma produção autônoma e sustentada de cortisol.

A forma esporádica de apresentação da PMAH parece ser a mais frequente (9). No entanto, já foram descritas na literatura cerca de 20 famílias com a forma herdada da doença (10-21). A real prevalência da forma familiar da PMAH ainda não é bem conhecida, uma vez que não é realizada uma avaliação sistemática dos parentes dos indivíduos portadores da doença (9). Suspeita-se que nas famílias com PMAH, o padrão de transmissão da doença seja autossômico dominante, com penetrância incompleta conforme descrito na maior genealogia publicada (10-22)

Tabela 1. Classificação etiológica da síndrome de Cushing endógena

ETIOLOGIA		
ACTH-dependente	Doença de Cushing	70%
	Síndrome do ACTH ectópico	10% a 15%
ACTH-independente	Adenoma suprarrenal	10%
	Carcinoma suprarrenal	5%
	PMAH (dependente de ACTH ectópico - suprarrenal)	<2%
	PPNAD	<2%
	Síndrome de McCune-Albright	<< 1%

Tabela 2. Diferentes designações da mesma doença ao longo do tempo

Nodular hiperplasia of suprarrenal
ACTH-independent massive bilateral suprarrenal disease
Massive macronodular hiperplasia
Massive suprarrenal hiperplasia
Giant macronodular suprarrenal hiperplasia
Huge bilateral adrenocortical multinodular hiperplasia
Macronodular suprarrenal hiperplasia
Macronodular suprarrenal disease
Macronodular suprarrenal dysplasia
Macronodular adrenocortical hiperplasia
ACTH-independent macronodular suprarrenal hiperplasia - PMAH
Bilateral Macronodular Suprarrenal Hyperplasia – BMAH
Primary Macronodular Suprarrenal Hyperplasia – PMAH

Kirschner MA, JCEM. 1964 ; AiBa M, Am J Clin Pathol. 1991; Sasano H, Mod Pathol. 1994; Swain JM, Arch Surg. 1998; Assié G, NEJM. 2013; Louiset E, NEJM. 2013; Alencar GA, JCEM 2014

1.3 Aspectos clínicos e laboratoriais da PMAH

Os pacientes geralmente são diagnosticados com PMAH quando estão sob investigação da síndrome de Cushing manifesta ACTH-independente e nodulos adrenais bilaterais, ou quando estão sendo avaliados devido a identificação de IS bilaterais (US/CT/RM) (14,18).

Até recentemente, acreditava-se que a doença se manifestasse principalmente sob a forma de SC clássica (manifesta), ao redor da 5^a e 6^a década de vida com discreta prevalência para o sexo feminino, no entanto a forma subclínica parece ser a

apresentação mais frequente da doença, porém sub-diagnosticada (23,24). Na maioria dos pacientes com PMAH os sinais e sintomas decorrentes do hipercortisolismo são discretos. Nos pacientes com a forma subclínica da doença evidencia-se principalmente a ausência da supressão normal do cortisol sérico, após o teste de supressão *overnight* com 1 mg de dexametasona via oral (V.O) à meia-noite (DST); (7, 23). Nos pacientes com PMAH e SC clássica, o ACTH plasmático habitualmente está abaixo do limite do ensaio e o cortisol urinário elevado (7, 21, 24).

A evolução clínica da PMAH parece ocorrer de forma lenta e insidiosa. Ohashi e cols (25) relataram o caso de um paciente com PMAH que levou sete anos para progredir da SC subclínica à SC clássica. Swain e cols (26) descreveram uma série com nove pacientes com a forma esporádica da doença. O tempo médio entre o aparecimento das primeiras manifestações clínicas e o diagnóstico da PMAH nesses pacientes foi de cerca de 8 anos. Entretanto, é importante destacar que a história natural da PMAH ainda não é bem compreendida, não se sabe, por exemplo, se necessariamente todos os pacientes evoluirão para a SC clássica ao longo dos anos.

A exemplo da maior genealogia já estudada por Alencar G e cols pode –se observar que os achados radiológicos mais frequente nas TCs dos pacientes com PMAH familiar foi o espessamento de ambas as glândulas adrenais, associado à presença de nódulos bilaterais. O espessamento difuso das adrenais sem a distinção de nódulos e a presença de alterações radiológicas em somente uma das glândulas também foram observados com frequência. Assim, a possibilidade de achados radiológicos distintos na PMAH familiar deve ser levada em consideração, para a interpretação correta dos exames de imagem. A relevância destes achados, forma não sincrônica de acometimento das

glândulas suprarrenais, implica na dificuldade de estabelecer o diagnóstico da PMAH. (Tabela 3).

Tabela 3. Dados hormonais e características do exame radiológico de uma família Brasileira com PMAH.

Ind.	Sexo	Idade (anos)	Valor do F sérico após 1 ^o TSDexa (VR < 1,8 mcg/dL)	Valor do F sérico após 2 ^o TSDexa (VR < 1,8 mcg/dL)	Valor da Dexa sérica durante 2 ^o TSDexa (VR 180-550 ng/dL)	Valor do 1 ^o F salivar à 0 h (VR ≤ 0,13 mcg/dL)	Valor do 2 ^o F salivar à 0 h (VR ≤ 0,13 mcg/dL)	TC
III-29	F	74	19,1	25,6	180	0,16	#	SRE espessada com nódulos SRD espessada com nódulos
III-32	F	70	12,0	10,5	681	< 0,10	< 0,10	SRE espessada com nódulos SRD espessada com 1 nódulo
III-35	F	67	3,7	1,8	182	< 0,10	< 0,10	SRE espessada com 1 nódulo SRD com 1 nódulo
IV-4	M	59	6,2	11,1	715	0,26	0,11	SRE espessada com nódulos SRD espessada com nódulos
IV-7	F	52	19,7	15,8	463	0,18	0,18	SRE espessada com nódulos SRD espessada com nódulos
IV-9	F	55	1,9	2,2	378	< 0,10	< 0,10	SRE normal SRD com 1 nódulo
IV-10	M	54	3,3	3,3	371	< 0,10	< 0,10	SRE normal SRD com 1 nódulo
IV-13	F	53	2,9	2,6	283	< 0,10	< 0,10	SRE espessada com 1 nódulo SRD com 1 nódulo
IV-18	M	45	15,0*	#	#	#	#	SRE espessada com nódulos SRD espessada com nódulos
IV-30	M	49	5,7	4,6	256	< 0,10	< 0,10	SRE espessada com nódulos SRD espessada com nódulos
IV-32	M	46	3,1	2,1	271	< 0,10	< 0,10	SRE espessada com nódulos SRD normal
IV-33	M	45	4,0	2,9	181	< 0,10	< 0,10	SRE espessada com nódulos SRD espessada com nódulos
IV-36	M	39	3,8	3,3	184	0,12	< 0,10	SRE com 1 nódulo SRD com 1 nódulo
IV-48	M	52	3,7	3,7	309	< 0,10	0,11	SRE espessada com 1 nódulo SRD normal
V-6	F	32	2,5	3,7	209	< 0,10	< 0,10	SRE normal SRD espessada com nódulos

Os casos IV-9, IV-10, IV-48 e IV-6 apresentam nódulos unilaterais (Adaptado de Ref. 22).

1.4 Hiper cortisolismo subclínico

A definição de síndrome de Cushing subclínica e hiper cortisolismo subclínico (HS), ainda é controversa na literatura. Recentemente, o *Guideline* da Sociedade Europeia de Endocrinologia (1), propõe que este grupo de pacientes seja caracterizado por não apresentar qualquer sinal específico da SC tais como: miopatia proximal, plethora facial, pele atrófica, hematomas aos mínimos traumas e *status* catabólico. Além disso os pacientes devem apresentar algum grau de autonomia da secreção do cortisol,

identificada pelo valor de supressão do cortisol sérico após o teste com dexametasona (1 mg) *overnight*.

O teste de supressão com dexametasona (1 mg) é o teste mais recomendado para avaliar anormalidades sutis da secreção de cortisol nos pacientes com nódulos adrenais cuja produção é subclassificada conforme descrição abaixo.

Classificação da produção de cortisol pelo DST

- A) Supressão normal do cortisol sérico ($\text{cortisol} \leq 1.8 \mu\text{g/dL}$);
- B) Possível secreção autônoma de cortisol ($1.8 \mu\text{g/dL} < \text{cortisol} \leq 5.0 \mu\text{g/dL}$);
- C) Secreção autônoma de cortisol ($\text{cortisol} > 5.0 \mu\text{g/dL}$).

1.5 PMAH e meningiomas do sistema nervoso central

Em 2005, Lee *et al.* (27) descreveram a ocorrência de meningiomas intracranianos em duas irmãs com PMAH. Os meningiomas são neoplasias derivadas das células aracnoideas, correspondem a cerca de 30% dos tumores cerebrais primários, sendo em sua grande maioria benignos (28). A incidência anual de meningiomas na população é de cerca 4,5 casos para cada 100 mil indivíduos, principalmente em pacientes idosos, sobretudo a partir da sétima década de vida e são duas vezes mais frequentes no sexo feminino (28). Identificamos na genealogia Brasileira 40% dos pacientes com PMAH apresentaram meningiomas do Sistema Nervoso Central (SNC) (21).

1.6 Características radiológicas da PMAH

A tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) habitualmente evidenciam na PMAH o aumento de ambas as glândulas suprarrenais associado à presença de nódulos bilaterais de cerca de 1-5 cm de diâmetro (8, 20, 22). O

aumento difuso das suprarrenais sem a distinção nítida dos nódulos, bem como a presença de assimetria entre as duas glândulas já foram descritos, podendo dificultar o diagnóstico correto da doença (20, 35). Os macronódulos podem ainda distorcer o parênquima suprarrenal normal, não permitindo, em alguns casos, a sua visualização. Na TC pós-contraste, geralmente é descrito na PMAH um reforço da imagem radiológica (22, 29), embora esse achado tenha sido recentemente questionado (37). Na RM, nas sequências pesadas em T1, as suprarrenais hiperplasiadas se apresentam hipointensas em relação ao fígado e isointensas em relação ao músculo. Já nas sequências pesadas em T2, as suprarrenais na PMAH geralmente se mostram hiperintensas em relação ao fígado, contrastando com a imagem da hiperplasia suprarrenal dependente de ACTH, que se mostra isointensa (18, 30,31). Geralmente, é descrito na PMAH a perda de sinal nas imagens obtidas em uma sequência fora de fase (técnica de *chemical-shift*), o que é compatível com um maior teor intracelular de lipídeos (18, 31).

Recentemente, alguns trabalhos têm sugerido que a tomografia por emissão de pósitrons (PET) com fluordesoxiglicose marcada (^{18}F -FDG) acoplada à tomografia computadorizada (^{18}F -FDG-PET/CT) poderia ser útil na diferenciação das lesões suprarrenais malignas e benignas (32,33). A ^{18}F -FDG-PET/CT tem sido utilizada como ferramenta adicional aos métodos de TC e RM, por permitir avaliar concomitantemente a anatomia da suprarrenal e sua atividade metabólica. Os carcinomas suprarrenais normalmente possuem um alto metabolismo glicolítico e conseqüentemente, uma captação maior de ^{18}F -FDG em relação aos adenomas, cuja atividade metabólica é menor. Desta forma, o valor padrão de captação máxima (SUVmax), parâmetro utilizado para quantificar a captação da ^{18}F -FDG, costuma estar mais elevado nos

carcinomas e nas metástases suprarrenais do que nos adenomas da glândula (34). Metser *et al.* (35) utilizaram um SUVmax igual a 3,1 como ponto de corte para diferenciar as lesões suprarrenais malignas ($\text{SUVmax} > 3,1$) das benignas ($\text{SUVmax} \leq 3,1$), obtendo uma sensibilidade de 98,5% e uma especificidade de 92% na distinção dessas lesões. Recentemente, Boland *et al.* (36) sugeriram que uma avaliação subjetiva da atividade de ^{18}F -FDG da lesão suprarrenal poderia ser útil. As lesões suprarrenais malignas apresentariam uma atividade de ^{18}F -FDG aumentada em relação ao fígado e as lesões suprarrenais benignas uma atividade igual ou inferior à desse órgão. Tessonier *et al.* (37), por sua vez, propuseram a utilização da razão SUVmax da lesão / SUVmax do fígado para a diferenciação das lesões suprarrenais. Utilizando o valor de 1,8 como ponto de corte, eles foram capazes de discriminar as lesões suprarrenais malignas e benignas com uma sensibilidade e especificidade de 100%.

1.7 Anatomopatológico da PMAH.

A hiperplasia macronodular suprarrenal primaria é uma neoplasia benigna, não tendo sendo descrito na literatura relatos de transformação maligna dessas lesões suprarrenais, mesmo após 8 anos de seguimento de pacientes sem qualquer tratamento (9). A análise macroscópica mostra, geralmente, o aumento do tamanho das suprarrenais, associado à presença de múltiplos nódulos de coloração amarelada que se sobressaem na superfície glandular (Fig. 1A). Nas suprarrenais normais, o peso combinado das duas glândulas varia geralmente de 8 a 12 g, enquanto na hiperplasia adrenocortical macronodular primaria o peso somado das suprarrenais é habitualmente maior que 60 g, podendo chegar a mais de 200 g. O exame microscópico das hiperplasias adrenocortical macronodular primaria revela a presença de múltiplas regiões nodulares de aspecto homogêneo, constituídos

predominantemente por dois grupos celulares distintos: um formado por células grandes de citoplasma claro e ricas em lipídios e dispostas difusamente, que expressam principalmente a 3 beta hidroxisteroide desidrogenase tipo 2 (3B-HSD2), e o outro constituído por células pequenas de citoplasma compacto, pobres em lipídios, dispostas em estruturas semelhantes a “ninhos” ou “ilhas” que expressam principalmente a 17 hidroxilase e 17/20-liase (Fig. 1B).

Figura 1. Fotografia da peça cirúrgica retirada de uma paciente com PMAH familiar e síndrome de Cushing clássica, aonde observa-se em (A) o aumento da glândula suprarrenal (seta maior) e a presença nódulos de coloração amarelada, com um dos nódulos isolado (seta menor); (B) Fotomicrografia de uma secção do tecido de uma hiperplasia suprarrenal macronodular, onde observa-se células de citoplasma claro grandes (ricas em lipídios), dispostas em cordões, e células de citoplasma compacto (pobres em lipídios), dispostas em estruturas semelhantes a “ninhos” ou “ilhas”.

Estudos que utilizaram os métodos de hibridização *in situ* e imunoistoquímica mostraram uma expressão distinta de algumas das enzimas esteroidogênicas (38). Nesse trabalho foi identificada a enzima 3 β -hidroxisteroide desidrogenase do tipo 2 (3 β -HSD2) expressa exclusivamente nas células grandes de citoplasma claro, enquanto a enzima 17 α -hidroxilase/17,20-liase (CYP17A1) foi expressa sobretudo nas células pequenas de citoplasma compacto. As demais enzimas esteroidogênicas

estão presentes nos dois tipos celulares, mas que frequentemente apresentam expressão reduzida. A PMAH apresenta esteroidogênese ineficiente, estando o hipercortisolismo relacionado principalmente ao aumento do número de células adrenocorticais (38).

Outro aspecto elucidado recentemente, foi a presença ectópica do ACTH avaliado por imunoistoquímica em *clusters* de células hiperplásicas dos nódulos da PMAH (10) (Figura 2). Nesse trabalho os autores mensuraram a produção de cortisol coletado por cateterização das veias suprarrenais após estímulos com análogos dos receptores aberrantes (39) que estão descritos como hiperexpressos na PMAH (40). A concentração plasmática de ACTH proveniente dos nódulos suprarrenais foi significativamente mais elevada quando comparada com à produção plasmática periférica (Figura 3).

Figura 2. Fotomicrografia de uma secção do tecido de uma hiperplasia suprarrenal macronodular, com imunoistoquímica para ACTH dos nódulos da PMAH. (A) Marcação do ACTH em *cluster*. (B) Marcação do ACTH difusa. (10).

Figura 3. Gráfico representando a comparação das concentrações do ACTH no cateterismo das veias suprarrenais e na periferia de pacientes com PMAH e com hiperaldosteronismo primário. As concentrações de ACTH das suprarrenais dos pacientes com PMAH são extremamente elevadas quando comparadas com as da periferia, em contraste, nos pacientes com aldosteronoma as concentrações de ACTH são semelhantes, tanto na periferia quanto nas veias suprarrenais, corroborando com a hipótese da produção ectópica intrasuprarrenal de ACTH (adaptado de ref.10).

1.8 Mecanismos moleculares envolvidos na PMAH

O processo fisiopatológico que culminaria com a PMAH, bem como as eventuais alterações genéticas predisponentes ainda não foram totalmente elucidados. Uma das principais hipóteses aventadas para o desenvolvimento da doença propõe a participação de receptores hormonais aberrantes ectópicos ou eutópicos no córtex suprarrenal, como receptores do peptídeo inibitório gástrico, da epinefrina e noraepinefrina, do hormônio luteinizante, etc, que inapropriadamente estimulariam a esteroidogênese e a hiperplasia da glândula, através da estimulação do receptor fisiológico do ACTH, o MC2R. Embora alguns autores defendam a hipótese de que a expressão destes receptores seria um evento inicial e essencial na patogênese da hiperplasia adrenocortical macronodular primária (39), outros argumentam que a presença dos receptores aberrantes seria, mais provavelmente, um epifenômeno resultante da proliferação e da perda da condição de diferenciação celular (37). No entanto, essas questões permanecem em aberto.

Nesse sentido, Louiset e cols. (40) descreveram uma complexa regulação do ACTH ectopicamente presente em *clusters* (Figura 2) celulares dos nódulos hiperplásicos, que sob estímulo de agonistas dos receptores aberrantes, tais como, 5-HT, LH, GIP, entre outros, levariam ao estímulo da secreção do ACTH intrasuprarrenal, que teria uma ação parácrina e autócrina, levando à produção do cortisol nas suprarrenais. No entanto, a suposição de que a produção ectópica de ACTH pela suprarrenal seria também responsável pela hiperplasia das células corticais, ainda necessita de estudos comprobatórios. Foi por meio dos achados desse trabalho que os autores sugeriram a alteração do nome de *ACTH-Independent Macronodular Suprarrenal Hyperplasia* (PMAH) para *Bilateral Macronodular Suprarrenal Hyperplasia* (BMAH).

Estudos recentes e independentes mostraram que mutações no gene *armadillo repeat containing 5* (*ARMC5*) são uma causa frequente de hiperplasia adrenocortical macronodular tanto na forma familiar como na forma potencialmente esporádica da doença (22, 41- 43). Mutações germinativas e diferentes eventos moleculares somáticos no mesmo paciente foram identificadas em 38-55% dos pacientes com a doença (22,44).

No Ambulatório de Suprarrenal do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFM-USP), cerca de 25% dos pacientes (5/21), suspeitos de apresentarem a forma (aparentemente) esporádica da PMAH, apresentaram mutações germinativas no gene *ARMC5* (22). Apesar da forma esporádica da PMAH ser mais diagnosticada, a forma herdada da doença parece ser mais frequente do que inicialmente se pensava. De fato, se desconhece a real prevalência da forma familiar da doença, já que rotineiramente, não é realizada uma avaliação sistemática ativa dos parentes dos

pacientes com PMAH. Até a presente data, foram descritas na literatura poucas famílias com a forma herdada da doença (11, 17, 22, 45-56).

Tabela 4. Número de famílias descritas de 1993 até 2015.

FAMÍLIA	Nº DE INDIVÍDUOS	GÊNERO	REFERÊNCIAS
1	2	2♀	Findlay et al.,1993
2	2	2♂	Oheda et al.,1995
3	4	2♀ E 2♂	Minami et al.,1996
4	3	1♀ E 2♂	Someya et al.,1996
5	2	1♀ E 1♂	Imöhl et al.,2002
6	2	1♀ E 1♂	Miyamura et al.,2002
7	7	6♀ E 1♂	Nies et al.,2002
8	2	2♀	Lee et al.,2005
9	2	2♀	Watson et al.,2007
10	4	2♀ E 2♂	Vezzosi et al.,2007
11	10	6♀ E 4♂	Bordeau et al.,2007
12	2	2♂	Gagliardi et al.,2009
13	6	3♀ E 3♂	Gao et al, 2013
14	3	3♂	Gagliardi et al.,2014
15	4	2♀ E 2♂	Gagliardi et al.,2014
16	3	1♀ E 2♂	Gagliardi et al.,2014
17	2	2♀	Gagliardi et al.,2014
18	2	2♀	Gagliardi et al.,2014
19	17	10♀ E 7♂	Elbelt et al.,2014
20	16	8♀ E 8♂	Alencar et al.,2014
21	4	2♀ E 2♂	Alencar et al.,2014
22	2	2♀	Alencar et al.,2014
23	2	1♀ E 1♂	Tanaka et al.,2015
TOTAL	111	58 ♀ (52,25%)	

A demonstração de um segundo evento no gene *ARMC5* nas hiperplasias (22,41,43,44,57), somado aos dados dos estudos funcionais em células de carcinoma adrenocortical H295R, onde a presença do gene normal desencadeou a via das caspases e morte celular, sugere que esse gene atue como um supressor tumoral (41).

Na maior família com PMAH já diagnosticada com a doença, foram identificadas mutações germinativas e somáticas no gene *ARMC5*. Nessa genealogia, a doença demonstrou um padrão de herança autossômico dominante, com penetrância incompleta e expressão clínica e radiológica variável (22), uma vez que indivíduos idosos com a mutação do *ARMC5* não apresentaram nenhuma evidência, laboratorial ou radiológica, da doença. A doença acometeu homens e mulheres com uma proporção semelhante, estava presente em três gerações consecutivas, herdada tanto pelo sexo masculino quanto pelo feminino e acometeu cerca de 50% dos irmãos em alguns segmentos da família. Trata-se da genealogia com o maior número de casos de PMAH e a mais extensivamente avaliada.

Devido a identificação de uma família Brasileira com mutação germinativa e somática do *ARMC5* tivemos a oportunidade de estudar 5 gerações, e observar que o desenvolvimento da hiperplasia macronodular nem sempre é sincrônico, bilateral ou com múltiplos nódulos. Portanto, restringir a investigação da PMAH somente nos casos com doença bilateral, como sugerido por vários autores (7, 10, 21), exclui a possibilidade de diagnóstico mais precoce. Desta forma mais uma vez justificamos a mudança do nome para *Primary Macronodular Suprarrenal Hyperplasia* (PMAH), que engloba todas as variantes da expressão da doença (22, 23)

1.9 O Gene e a proteína Armadillo Repeat Containing 5 (ARMC5)

Assié e colaboradores (42) demonstraram que o gene ARMC5 selvagem transfectado transientemente leva à morte celular de células da linhagem de carcinoma adrenocortical humana, células H295R. Demonstraram ainda que mutações do tipo missense no ARMC5 levam à perda da capacidade desta proteína de induzir apoptose ou induze-a mais tardiamente, demonstrando a importância das mutações na função desta proteína. Além disto, utilizando o silenciamento do ARMC5, foi observada a diminuição da expressão do RNAm do receptor de ACTH, o MC2R, do fator esteroidogênico 1 (SF1), de algumas enzimas esteroidogênicas, como CYP11A1 e CYP17A1, assim como da síntese do cortisol, sugerindo que a proteína ARMC5 pode ser importante na regulação da esteroidogênese. A demonstração de um segundo evento no gene ARMC5 nos nódulos de hiperplasia, seja uma mutação somática ou perda de heterozigose (LOH), somado aos dados dos estudos funcionais realizados nas células H295R, onde a hiperexpressão de ARMC5 levou à morte celular, e em células da PMAH, sugerem que este gene possa se comportar como um indutor de apoptose (42,58) .

O gene *ARMC5* está localizado no cromossomo 16p11.2, apresenta 6 exons na sua isoforma mais comum (NM_001105247) e codifica uma proteína de 935 aminoácidos, apresentando dois domínios distintos: são eles o domínio ARM-repeat na porção N-terminal, abrigando 7 repetições, e o BTB/POZ (Bric-aBrac, Tramtrack, Broad-complex/Pox vírus e Zinc finger) na porção C-terminal, como apresentando na Figura 4. Ambos os domínios são altamente conservados e medeiam interações proteína-proteína, o que novamente sugere que o ARMC5 tenha coparticipação com outras proteínas (42, 58)

Recentemente, as quatro isoformas do gene *ARMC5* foram analisadas em tecidos humanos normais, mostrando que ao menos uma isoforma deste gene é expressa ubiquamente no corpo humano, e que apenas sete tecidos do corpo apresentaram todas as isoformas, dentre eles a suprarrenal e o cérebro, sugerindo que o *ARMC5* possa também estar envolvido em outras patologias (55).

Neste contexto e reforçando a necessidade de analisar a importância da expressão do *ARMC5* em diferentes órgãos, foi identificada uma alta frequência de meningiomas em pacientes com PMAH, na sua forma familiar ou esporádica, que apresentavam mutação germinativa do gene *ARMC5*. Como exceção, há um caso cuja patogênese molecular da paciente estava associada a mutação somática em ambas as suprarrenais do gene *GNAS* (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) (59).

Recentemente, Elbelt e cols (55) descreveram uma paciente com PMAH e meningioma cuja mutação germinativa e somática no gene *ARMC5* foi identificada em leucócitos periféricos e no tecido do meningioma, o que sugere um papel adicional dessa mutação para desenvolvimento concomitante de meningioma intracranial e PMAH, conforme observado na clínica. Ainda que não se saiba inteiramente qual o papel do *ARMC5*, recentemente foi demonstrado que o *ARMC5* tem uma importância vital no desenvolvimento fetal de camundongos, na diferenciação de linfócitos T e na resposta imune de uma forma geral. Além disso, o *ARMC5* não apresenta atividade enzimática, e sua função depende de interações com outras proteínas, permitindo que esta interação module diferentes vias (58) .

Em novembro de 2013 nosso grupo, bem como o grupo do Prof Jérôme Bertherat do Service d'Endocrinologie, Hôpital Cochin, France, utilizando diferentes abordagens moleculares, identificaram um novo gene relacionado a PMAH na sua

forma familiar e esporádica, denominado *ARMC5* (*armadillo repeat containing 5*) (22, 41).

Foram identificadas mutações geminativas em cerca de 55% dos casos considerados de forma familiar e 21% dos aparentemente esporádicos, uma vez que os indivíduos considerados esporádicos, seus familiares não foram investigados ativamente.

O estudo funcional do *ARMC5* foi realizado pelo grupo do Prof. Bertherat, que mostrou em uma linhagem de carcinoma adrenocortical, células H295R, a correlação entre a expressão de *ARMC5* e apoptose (41). Recentemente, acabamos de realizar este mesmo estudo em cultura de células de PMAH, confirmando os mesmos achados do grupo Francês, e além disso, os estudos funcionais revelaram alterações no ciclo celular abrindo sobremaneira novas pesquisas nesta área (58).

A proteína *ARMC5* pertence à família das proteínas Armadillo, no entanto, ainda se desconhece o papel desempenhado pela mesma na fisiopatologia da PMAH. As proteínas da família Armadillo 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* (60). As unidades das proteínas ARM repetidas, formam, em conjunto, uma super-hélice, que formam uma plataforma versátil que permite interações com outras proteínas, e que por isso apresentam mais de uma função celular. As proteínas ARM em eucariotos, de um modo geral, têm importantes e diversas funções celulares (61). Uma das proteínas da família Armadillo mais estudada é a β -catenina (CTNNB1, i.e. Catenin (cadherin-associated protein), beta 1; ARM em *Drosophila*) que apresenta interações com outras proteínas, e tem funções relacionadas ao desenvolvimento, na adesão celular e na sinalização, uma vez que é capaz de se deslocar até o núcleo e

alterar a expressão gênica (62). Outra proteína da família ARM, cuja função tem sido elucidada, é a proteína ARMC8 que parece fazer parte do complexo de degradação do proteasoma/ubiquitina em leveduras e humanos. Além disso, em humanos, os ARM-repeats de ARMC8 parecem potencializar a interação das proteínas receptores de membrana com um adaptador de sinalização, permitindo ubiquitinação e degradação lisossomal (61) . De uma forma geral as proteínas ARM são proteínas conservadas, e, portanto, devem ter um papel importante em vários órgãos, mas ainda permanecem com suas funções pouco ou nada conhecidas, como é o caso da ARMC5.

Justificativa

1. Justificativa

Mutações germinativas do gene *ARMC5* são consideradas a principal causa genética da PMAH. Formas familiares e esporádicas da PMAH, em geral, estão associadas a nódulos adrenais bilaterais. No entanto, nódulos adrenais unilaterais foram descritos em familiares dos casos-índice com mutações germinativas do gene *ARMC5*. Nós questionamos se os pacientes com incidentalomas adrenais unilaterais esporádicos e autonomia da secreção do cortisol poderiam fazer parte do amplo espectro da PMAH. Além disso, qual seria a frequência de mutações germinativas do *ARMC5* nos pacientes com incidentaloma bilateral das suprarrenais com hipercortisolismo subclínico e nos pacientes com suspeita clínica de síndrome de Cushing e nódulos bilaterais.

2. Objetivos

1. OBJETIVOS

1. Avaliar a presença de variantes alélicas germinativas do *ARMC5* em pacientes com nódulos suprarrenais bilaterais ou unilaterais associados a possível/autônoma secreção de cortisol.
2. Analisar a frequência das variantes alélicas germinativas do *ARMC5* em pacientes com diagnóstico laboratorial de síndrome de Cushing ACTH-independente associado a nódulos adrenais bilaterais.

3. Métodos

1. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto, multicêntrico foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (#45866415.5.0000.0068).

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1 Casuísticas – Número total de pacientes avaliados: 247 pacientes

1) Pacientes com nódulos suprarrenais bilaterais incidentais

Selecionamos 160 pacientes de uma coorte multicêntrica (105 mulheres - idade entre 30 e 84 anos e 55 homens - idade entre 17 e 75 anos).

1) Pacientes com nódulos suprarrenais unilaterais incidentais

Selecionamos 74 pacientes de uma coorte multicêntrica (54 mulheres – idade entre 32 e 68 anos e 20 homens – idade entre 29 a 69 anos).

2) Pacientes com síndrome de Cushing e nódulos suprarrenais bilaterais

Selecionamos 13 pacientes do Ambulatório de Endocrinologia e Metabologia do HCFMUSP (11 mulheres – idade entre 30 e 73 anos e 2 homens de 51 e 53 anos). Os pacientes tiveram o diagnóstico entre 2000 a 2018.

4.2 Avaliação por imagem radiológica (TC)

Todos os pacientes realizarem TC de abdômen, sendo o exame avaliado por um radiologista especializado de cada centro, sem conhecimento prévio do resultado molecular. O diâmetro máximo e o número de nódulos de cada glândula suprarrenal

foram considerados no exame de TC. Radiologicamente a classificação de PMAH foi definida pela presença de nódulos bilaterais, maiores que 1cm.

4.3 Diagnóstico patológico

Todos os pacientes que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, o diagnóstico histológico foi confirmado pelo patologista especialista.

4.4 Extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico

Os DNAs de leucócito foram extraídos pelo método de *Salting Out* de acordo com o protocolo abaixo, estabelecido pelo laboratório LIM42, para análise de mutações germinativas do gene *ARMC5*.

Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas em três tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Vacutainer K2 EDTA 7.2 mg, Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA). A técnica de salting-out modificada (precipitação por salificação) será utilizada para a extração do DNA genômico das amostras de sangue. Inicialmente, será realizada a lise das hemácias. Nessa etapa, o sangue foi misturado à uma solução de lise (NH_4Cl a 114 mM, NH_4HCO_3 a 1 mM) e incubado a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 4 °C durante 15 minutos, e o sobrenadante desprezado. Todo o procedimento para a lise das hemácias foi repetido mais uma vez. Na etapa seguinte, foi realizada a lise dos leucócitos. O botão leucocitário, inicialmente, foi suspenso em 9 mL de solução de lise de glóbulos brancos, contendo: TE (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM pH 8,0), 180 mL de dodecilsulfato de sódio a 10% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 150 mL de proteinase K a 10 mg/mL (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA). Em seguida, essa solução foi incubada a 37 °C por 18 horas. Após esse período, foram adicionados 3,6 mL de solução saturada de NaCl a 6 M, e o material vigorosamente agitado

por 15 segundos e centrifugado por 15 minutos. Na etapa seguinte, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e o DNA precipitado, acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado. Após a homogeneização cuidadosa, o DNA precipitado foi retirado do tubo e, em seguida, lavado em etanol a 70% durante 5 minutos. Essa última operação foi repetida por mais três vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto e, em seguida, centrifugado a vácuo (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Após todo esse processo, o DNA foi ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0). A concentração do DNA foi medida em um espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha), no comprimento de onda de 260 nm. Uma relação acima de 1,8 entre as leituras 260 e 280 nm foi considerada ideal para caracterizar a pureza do material.

4.5 Extração de DNA de tecido fresco ou congelado

Os pacientes que possuíam tecidos disponíveis congelados tiveram DNA destes fragmentos extraídos através do Genomic DNA Isolation Kit (Gentra System), para a análise de mutações.

4.6 Análise molecular

Os *primers* para amplificação pela PCR das regiões codificadoras do *ARMC5* foram desenhados com auxílio do software Primer3 v4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Os protocolos para PCRs foram padronizados para cada para jogo de primers, em termociclador modelo PTC- 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA) com bloco de gradiente de temperatura.

Os produtos de PCR foram submetidos à purificação para retirada de impurezas e dímeros de primers utilizando PureLink™ PCR Purification kit (Invitrogen, USA). A

reação de seqüenciamento foi realizada com o reagente BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City CA) utilizando os mesmos primers da PCR e o seqüenciamento automático foi realizado em equipamento ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA). Utilizamos o DNA genômico e oligonucleotídeos iniciadores (primers) intrônicos específicos para a amplificação do gene ARMC5 (tabela 5). As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 uL, contendo: 50 ng de DNA genômico, 200 uM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs) (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA), 15 pmol de cada primer específico (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA), 0,75 U da enzima Go Taq® DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e 5 uL da solução tampão 5x Green Go Taq Reaction Buffer (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). A PCR foi realizada em um termociclador Veriti (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA) e consistia nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, de anelamento dos primers, variando de acordo com cada jogo, de 52° a 60 °C por 30 segundos e de extensão a 72 °C por 40 segundos; e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com SYBR Safe DNA Stain (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA) e serão visualizados por transiluminação em luz ultravioleta. A intensidade do sinal emitido pelos produtos da PCR foi comparada àquela emitida pelo Low DNA Mass Ladder (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA), um marcador de peso molecular cuja concentração é conhecida, permitindo quantificar o DNA amplificado. Os produtos da PCR foram incubados com as enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I a 37°C por 15 minutos e, posteriormente, a 80°C por mais 15 minutos. Essas enzimas, contidas no produto comercial ExoSAP-IT

(Affymetrix Inc., Cleveland, OH, EUA), permitiram a purificação do DNA amplificado. A essa solução purificada, foi adicionado 1uL de Big Dye Terminator (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA), 1 mcL de tampão Save Money (Tris-HCl 0,2 mM; MgCl₂ 5 mM) e 5 pmol de um dos primers (sense ou anti-sense), realizamos, em seguida, a reação de sequenciamento em um termociclador Veriti (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA): 25 ciclos a 96 °C por 10 segundos, a 50 °C por 5 segundos e a 60 °C por 4 minutos. Os produtos dessa reação foram submetidos à eletroforese capilar em um sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA) e o eletroferograma gerado pelo programa Sequencher 5.0.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology and Information (NCBI).

Tabela 5. *Primers* utilizados para amplificação da região codificadora do gene *ARMC5*.

EXONS	PRIMERS SEQUENCE	
	FORWARD	REVERSE
EXON 1	TCAGCGGTAAGGCTTTTAGC	TAGAGCCTGACCATTTTCCG
EXON 2	AGGGCTAGAGCCTGACCATT	GAAGCGAGCCTAGAGGAGAA
EXON 4	CCGACC ATTAGCCTCTTCTG	GCTTGTGGAGAGCCTGACAG
EXON 5	GCTGGTAAGAGGCTGTGAGG	TCCACCCCTATTCTGTCTGAA
EXON 6	AGGATCCCACAACATGCATTC	GCTTCATGGCGTTA CTGCTA
EXON 7 e 8	TCTCACCCAGAGGTTTCACC	GTGAGAACATGGAACCGGAC

Tabela 6. *Primers* utilizados para amplificação da região codificadora do gene *ARMC5* em tecidos conservados em emblocados de parafina.

Exons	Sequência dos <i>primers</i>	
	Sense	Anti-sense
P3F/R2	TCAGCGGTAAGGCTTTTAGC	GTAGCAGCGCGAGTAGGG
P3F/R3	AGCGACCAACGAGACACCC	GAAGCGAGCCTAGAGGAGAA
P3F/R1A	GGGCAGAAGAAAGGCTTGA	TCGGCTGAGTTCCAGGAG
P3F/R1B	TCCGTAACCTGGCAGACTC	TTGGGCTAGCTCCATTAGGA
P3F/R1C	GGAGGTGCTGGTAGATGAGC	AGGAAAGTCCCAGGAAGCAG
P3F/R1D	CATGGCACCCCTCGTATTGT	GGACCAAGACAGACACAAACC
P4F/R1A	GGACTCTGCCCCCTTAACCTT	ATAGGTCAGCAGGCCGTACA
P4F/R1B	AGCCCTGCTGCTGCTGTC	TGAGTGGGAAGGTGAGGTTC
P5F/R	AGAGCCCTGTCTCACTCACC	GGAAGAGAGGGCCTTTCAA
P6F/RA	GGGGAGGAGTGCTGTGTTT	GCCCAGCAGAGGTTTCATAGA
P6F/RB	CTTTCCTGCCTCCAAGACCT	CACCAGGCGACAGACCTC
P6F/RC	CACTTCCTGCTGGACTCAGG	GGAACACCTCACCCACTGAC
P6F/RD	CTGCTGGCCGTTTCCTACT	TCACAGCCAATTCATCCTTG

A análise das variantes obtidas foram realizadas através dos seguintes sites de predição: Mutation Taster, Poly-Phen, Sift, PANTHER and VarSome, e as referências de transcrito foram: ENST00000268314, NM_001105247.1- OMIM.

4. Resultados

1. RESULTADOS

5.1 Gene *ARMC5*

1) Pacientes com nódulos suprarrenais bilaterais incidentais

Dos 160 pacientes analisados para variantes alélicas germinativas patogênicas do *ARMC5*, nenhum deles apresentou qualquer variante alélica patogênica. Identificamos 101 pacientes com variantes alélicas germinativas não patogênicas. Independente ou não da autonomia da secreção do cortisol.

Identificamos em uma única paciente com diagnóstico de doença celíaca e incidentaloma bilateral suprarrenal, que realizou exame de imagem CT e identificou em 2011 nódulos adrenais bilaterais a variante alélica patogênica c.1084C>T p.Arg363Tr, no exon 3 no domínio de dimerização BTB da proteína *ARMC5*. A paciente apresentava o polimorfismo c.2114C >T , p.Ala705Val, rs 11150624. Durante a investigação ativa dos seus familiares identificamos que sua irmã e sua sobrinha também eram carreadoras da mesma variante alélica patogênica (de acordo com os sites de predição, previamente referenciados). O teste de supressão do cortisol sérico de ambas (irmã e sobrinha do caso index) foi compatível com possível secreção autônoma do cortisol (cortisol de 3.5 ug/dL e 4,3 ug/dL respectivamente).

2) Pacientes com nódulos suprarrenais unilaterais incidentais

Dos 74 pacientes analisados para variantes alélicas germinativas patogênicas do *ARMC5*, nenhum deles apresentou qualquer variante alélica patogênica. Identificamos em 47 pacientes variantes alélicas germinativas não patogênicas.

Tabela 7. Análise germinativa das variantes alélicas do *ARMC5* dos 74 pacientes com nódulos suprarrenais unilaterais incidentais

Casos	Gênero	Variantes polimórficas do <i>ARMC5</i>	Exon
1	F		
2	F		
3	F	c.1864+250C>T. rs11150624	4
4	F	c.1864+250C>T. rs11150624 ; c.2790G>A. p.Gly930=. rs61734240	4; 6
5	F		
6	F		
7	F		
8	F	c.2790G>A. p.Gly930=. (hetero). rs61734240	6
9	F		
10	F	c.41T>A; p.Phe14Tyr; rs151069962;	1
11	F	c.508A>G. p.Ile170Val. rs35923277	2
12	M	c.1864+250C>T. rs11150624	4
13	F	c.1641G>A. p.Ala547=. rs11150624	4
14	F		
15	F	c.2073G>A; p.Pro691= . rs146763279	6
16	M		
17	M		
18	F	c.438G>A. p.Arg146=. rs201280100	1
19	F		
20	F		
21	F	c.1864+250C>T. rs11150624. p.Ala922=	4;6
22	M		
23	F	c.1864+250C>T. rs11150624	4

24	F		
25	M	Rs151069962 p.F14Y	1
26	M	c.106-152C>G . rs117600469; p.Pro507Leu; rs142376949; c.2058G>A.p.Ala686=. rs11863886	1;4;6
27	M	c.1842C>G. p.Leu709=, rs55800131; c.1864+250C>T. rs11150624	4
28	M	rs35923277 p.I170V	1
29	M		
30	F	c.508A>G. p.Ile170Val; rs35923277	2
31	F		
32	F	rs35923277 p.I170V	1
33	F	c.1864+250C>T. rs11150624	4
34	F		
35	F		
36	F		
37	F	c.1864+250C>T. rs11150624	4
38	F	c.1864+250C>T. rs11150624	4
39	F		
40	F		
41	F	rs28451331 SNP – 5'UTR - p.T42K	5'UTR
42	M	c.1864+250C>T. rs11150624	4
43	F		
44	F	c.1864+250C>T. rs11150624	4
45	M	c.174C>T. p.Ile58=.rs181081811; c.1842C>G. p.Leu614=. rs55800131.	1;4
46	M	c.1864+250C>T. rs11150624	4
47	F	ENST00000408912. c.105+111G>A. rs114519904 ; c.583+26G>T. . rs9921490	1; 2
48	M	c.1842C>G. p.Leu614=. rs55800131	4

49	M	c.1864+250C>T. rs11150624	4
50	F		
51	F	c.1842C>G. p.Leu614=. rs55800131; rs11150624	4
52	F	c.1864+250C>T. rs11150624	4
53	F		
54	F	c.1864+250C>T. rs11150624	4
55	F	c.1842C>G. p.Leu614=. rs55800131; (CTC>CTG). c.1864+250C>T. rs11150624	4
56	M		
57	F	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
58	M	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
59	F	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
60	F	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
61	M	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
62	F	rs9926717 A/G	intron 1
63	M	rs9926717 A/G	intron 1
64	F	none	
65	F	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
66	M	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
67	F	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
68	F		
69	F	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
70	F	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
71	F	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
72	M	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)
73	F	rs377719718 GGCCT/GGCCT (homozygous)	1 (5'UTR)
74	F	rs3813002 C/T	1 (5'UTR)

3) Pacientes com síndrome de Cushing e nódulos suprarrenais bilaterais

Os pacientes foram referenciados ao nosso serviço para estabelecer o diagnóstico de diferencial de síndrome de Cushing endógena. Todos os pacientes apresentaram secreção autônoma do cortisol associado a concentrações baixas do ACTH. Os exames de imagem radiológica evidenciaram o acometimento bilateral das suprarrenais. Todos os pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico para controle do hipercortisolismo. Somente uma paciente realizou adrenalectomia total bilateral, compatível com o tratamento da década de 80. Todas as outras realizaram adrenalectomia total unilateral acrescida de adrenalectomia parcial contra lateral da menor glândula. As pacientes desenvolveram insuficiência adrenal secundária por períodos distintos no pós-operatório, necessitando de reposição com hidrocortisona até o pleno estabelecimento do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal.

Todas as 13 pacientes apresentaram variantes alélicas patogênicas germinativas, previamente descritas na literatura (22). A partir desses casos-index constituímos 6 novas famílias não relacionadas com 10 membros rastreados e carreadores da mutação no *ARMC5*. Nos outros casos índices, a existência de outros membros afetados não pode ser comprovada, sendo denominados de casos *aparentemente esporádicos* (7 pacientes).

Tabela 8. Análise germinativa das variantes alélicas do *ARMC5* dos 13 pacientes índice com síndrome de Cushing e nódulos suprarrenais bilaterais.

Caso	Gênero	Variantes polimórficas do <i>ARMC5</i>	Exon	Variantes patogênicas do <i>ARMC5</i>	Exon
1	F			c.968G>A, p. Gly323Asp	3
2	M	c.583+26G>T, rs9921490; c.729C>T, p. Ala 243=, rs114871627; c.1864+250C>T, rs11150624; c.2040T>C, p. Gly680=, rs116201073	2, 3, 6	c.281_281delC, p. Ser94Cysfs*43	1
3	M	c.-173C>T, rs139912838; c.583+26G>T, rs9921490; c.1864+250C>T, rs11150624; c.2040T>C, p. Gly680=, rs116201073	1, 2, 4, 6	c.1960C>T; p. Arg654*	5
4	F	c.2114C>T, p. Ala705Val, rs11150624	6	c.1084C>T, p. Arg362Trp	3
5	F	c.41T>A, p. Phe14Tyr, rs151069962	1	c.170_171insA, I58Nfs*45	1
6	F			c.1094T>C, p. Leu365Pro, rs587777663	3
7	M	c.2114C>T, p. Ala705Val,	6	c.799C>T, p. Arg267*,	3

rs11150624			rs369721476		
8	F	c.508A>G; p.Ile170Val	2	c.1985C>A, p.Pro662Hist	5
9	F	c.2114C>T, p.Ala705Val, rs11150624	6	c.1090C>T, p.Arg364*	3
10	M	c.2114C>T, p.Ala705Val, rs11150624	6	c.393-394dupTT, p.Leu131Phefs*7	1
11	F	c.2114C>T, p.Ala705Val, rs11150624	6	c.1094T>C, p.Leu365Pro, rs587777663	3
12	F	c.41T>A, p.Phe14Tyr, rs151069962; c.1864+250C> T, rs11150624	1,4	c.173dupA, p.Ile58Asnfs*45	1
13	F	c.-1103G>A; rs115527944	5'UTR	c.2697dupG, p.Leu900Serfs*12	6

F: feminino; M: masculino

Tabela 9. Análise germinativa das variantes alélicas do *ARMC5* das 6 famílias não relacionadas com 10 membros rastreados e carreadores da mutação do *ARMC5*.

Parente do Índice	Caso	Gênero	Variantes polimórficas do <i>ARMC5</i>	Exon	Variantes patogênicas do <i>ARMC5</i>	Exon
1	1	F	c.2114C>T, p.Ala705Val, rs11150624	6	c.968G>A, p. Gly323Asp	3
1	2	F			c.968G>A, p. Gly323Asp	3
2	3	F			c.281_281delC, p.Ser94Cysfs*43	1
3	4	F	c.968G>C, p.Gly323Ala, rs35461188; c.1864+250C>T, rs11150624	3, 6	c.1960C>T, p.Arg654*	5
3	5	F			c.1960C>T, p.Arg654	5
3	6	M	c.2058G>A, p.Ala686=, rs11863886	6	c.1960C>T, p.Arg654*	5
4	8	F			c.1084C>T, p.Arg362Trp	3
4	9	F			c.1084C>T, p.Arg362Trp	3
5	10	M			c.170_171insA, I58Nfs*45	1
6	11	F			c.1094T>C, p.Leu365Pro, rs587777663	3

F: feminino; M: masculino

5.2 Autonomia da secreção do cortisol de acordo com o DST

1) Pacientes com nódulos suprarrenais bilaterais incidentais

Dentre os 160 pacientes com nódulos suprarrenais incidentais bilaterais, 98 foram submetidos ao teste de supressão do cortisol com 1mg de dexametasona *overnight*. 33/98 (33,7%) apresentaram supressão normal do cortisol sérico após DST; 39/98 (39,8%) foram classificados como possível secreção autônoma do cortisol e 26/98 (26,5%) foram classificadas como secreção autônoma de cortisol.

2) Pacientes com nódulos suprarrenais unilaterais incidentais

Todos os 74 pacientes com nódulos suprarrenais incidentais unilaterais foram submetidos ao teste de DST, 27/74 (36,5%) tiveram supressão normal do cortisol sérico; 39/74 (52,7%) foram classificados como possível secreção autônoma de cortisol e 8/74 (10,8%) foram classificados como secreção autônoma de cortisol (Tabela 14).

Quanto à localização dos nódulos suprarrenais, a 48/74 (65%) encontrava-se do lado esquerdo. Três casos (4,1%) progrediram de uni para bilateral num período de tempo de 2 anos e 9 meses, 1 ano e 10 meses e 7 meses respectivamente. O paciente que apresentou o nódulo contra-lateral durante o seguimento de 1 ano e 10 meses, mostrou um aumento do valor do cortisol sérico pos DST de 8.9 µg/dL para 12.8 µg/dL. Ele manteve as concentrações do cortisol salivar a meia noite e urinários de 24 horas dentro dos limites da normalidade. Paciente foi submetido ao teste do DDAVP que não apresentou resposta compatível à síndrome de Cushing, sendo classificado como estado de pseudo Cushing, provavelmente devido a estado depressivo (DDAVP 10 ug ev cortisol basal acima de 12 ug/dL sem incremento absoluto de 18 em relação ao ACTH) (Tabela 14).

Tabela 10. Dados hormonais e radiológicos dos 74 pacientes com nódulos suprarrenais unilaterais incidentais.

Casos	Gênero	Lado suprarrenal	Diâmetro do nódulo (cm)	Cortisol após DST (ug/dL)	ACTH plasmático (pg/mL)
1	F	Esquerda	2,3	2,1	5,7
2	F	Esquerda	2,1	nl	N/A
3	F	Direita	1,7	nl	7
4	F	Esquerda	2	11	14,6
5	F	Direita	2,5	2,5	26
6	F	Esquerda	3	2	64,4
7	F	Direita	1	1,6	4,3
8	F	Direita	3,8	3,9	11,3
9	F	Esquerda	4,7	2,7	4,9
10	F	Esquerda	1,5	3,4	10,1
11	F	Esquerda	2	1,3	14
12	M	Esquerda	1,5	1,3	49
13	F	Esquerda	2	2,3	11
14	F	Esquerda	3,4	6,3	<1
15	F	Direita	2,4	1,4	74,7
16	M	Esquerda then Direita	1,5	8,9	N/A
17	M	Esquerda	1,6	2,5	12,1
18	F	Esquerda	2	2,6	35
19	F	Direita	4	1,6	29,2
20	F	Esquerda	3	1,3	23,2
21	F	Direita	1,7	1,3	23,8
22	M	Esquerda	1,5	2,8	12,1
23	F	Direita	2,8	3,1	2,9
24	F	Esquerda	2	22	<1

25	M	Esquerda	1,6	1,5	20,6
26	M	Esquerda	3,7	5,4	78,9
27	M	Direita	1,5	1,8	14,3
28	M	Esquerda	3,2	11	44,5
29	M	Esquerda	2,5	3,5	8,4
30	F	Esquerda	1,5	1,3	94,2
31	F	Esquerda	2,1	2,7	<1
32	F	Direita	3,7	1,6	11,4
33	F	Esquerda then Direita	2,2	1,3	7,8
34	F	Esquerda then Direita	1,3	1,4	5
35	F	Esquerda	2,5	1,3	21,2
36	F	Direita	2,1	2,8	7
37	F	Direita	1,6	1,6	4
38	F	Esquerda	2	4,8	8,4
39	F	Esquerda	5	1,3	40,5
40	F	Direita	2,3	2,1	2
41	F	Direita	4	3	30,4
42	M	Direita	2,6	1,8	7
43	F	Esquerda	2,4	1,3	18,6
44	F	Direita	2,5	2	14
45	M	Direita	2,2	2,3	46
46	M	Esquerda	1,5	1,8	N/A
47	F	Esquerda	2	1,4	17,3
48	M	Esquerda	1,2	2,1	19,8
49	M	Direita	2	1,1	18
50	F	Esquerda	3,6	3,9	5
51	F	Esquerda	3,7	8,2	25,4
52	F	Esquerda	3,2	2,2	15,8

53	F	Direita	3,5	1,7	19
54	F	Esquerda	1,5	1,9	6,1
55	F	Esquerda	2,5	2,2	8,9
56	F	Direita	N/A	2	15,3
57	F	Esquerda	N/A	2,4	7,7
58	M	Esquerda	N/A	1,2	35
59	F	Esquerda	N/A	1,6	45
60	M	Direita	N/A	2,5	69
61	F	Esquerda	N/A	<1	20
62	F	Esquerda	N/A	1	29
63	M	Esquerda	N/A	<1	17
64	F	Direita	N/A	2	57
65	M	Direita	N/A	1,4	44
66	F	Esquerda	N/A	1	34
67	F	Esquerda	N/A	<1	21
68	M	Esquerda	N/A	1	27
69	F	Esquerda	N/A	4,2	117
70	F	Esquerda	N/A	<1	18
71	F	Direita	N/A	2,5	69
72	F	Esquerda	N/A	1,6	47
73	F	Esquerda	3,7	1,4	39
74	M	Esquerda	2	<1	14

F: feminino; M: masculino; DST: Teste de supressão com 1mg de dexametasona V.O *overnight*;
D: Direita; E: esquerda; N/A: não avaliado; Valores de referência do ACTH: 10 to 60 pg/mL;
Fsali: cortisol salivar (valores de referência < 0,13 ug/dL); FU:cortisol urinário (valores de
referência de 30 a 310 ug/24h)

Pacientes com síndrome de Cushing e nódulos suprarrenais bilaterais

Dos sete casos índices, com mutação germinativa do *ARMC5*, todos apresentaram secreção autônoma de cortisol e seis deles foram submetidos à cirurgia devido à síndrome de Cushing manifesta.

Os 11 membros carreadores da mutação oriundos da investigação ativa dos familiares dos 7 casos index não relacionados, foram considerados casos familiares da PMAH. Seis de 11 pacientes realizaram tomografia e 1 ultrassonografia de abdomen (criança de 3 meses); 4 deles apresentaram nódulos suprarrenais bilaterais 3 eram absolutamente normais. Os quatro pacientes com nódulos bilaterais, realizaram o DST e 3 apresentaram secreção autônoma do cortisol e 1 com possível secreção autônoma. Duas pacientes (# 2 e #7) tinham síndrome de Cushing manifesta e foram submetidas a suprarrenalectomia total da maior glândula e subtotal da menor (suprarrenal sparing surgery) (22, 64) (Tabela 3). O segundo evento molecular do gene supressor tumoral *ARMC5* foi invstigado nos tecidos adrenais e, nestas duas pacientes não foi identificado um novo evento molecular .

Dos sete casos índice, com mutação germinativa do *ARMC5* e sem nenhum familiar pesquisado ou carreador da mutação no *ARMC5*, todos apresentaram secreção autônoma de cortisol e dois deles foram submetidos à cirurgia devido à síndrome de Cushing manifesta.

Tabela 11. Dados hormonais e radiológicos dos 7 casos índice considerados PMAH-familiar.

Caso Índice	Gênero	Idade	Diâmetro do nódulo (cm)	Cortisol após DST (ug/dL)	ACTH plasmático (pg/mL)
1	F	43	N/A	12	<5
2	M	53	D3,5 E2	8,3	<5
3	M	51	D3,2 E2	10,5	<5
4	F	65	N/A	7,3	<5
5	F	61	D2 E2	8	<5
6	F	30	D12,8 E12,5	17,7	<5
7	F	73	D3 E1.7	6,7	<5

F: feminino; M: masculino

Tabela 12. Análise germinativa das variantes alélicas do *ARMC5* dos 11 membros rastreados de 7 famílias não relacionadas e carreadoras da mutação do *ARMC5*.

Parente do Índice	Caso	Gênero	Idade (anos)	Diâmetro do nódulo (cm)	Cortisol após DST (ug/dL)	ACTH plasmático (pg/mL)
1	1	F	65	D 1,7 E 3	12,2	<5
1	2	F	30	N/A	N/A	N/A
2	3	F	12	N/A	N/A	N/A
3	4	F	69	N/A	12,4	<5
3	5	F	0,25	N/A	N/A	N/A
3	6	M	55	NORMAL	N/A	N/A
4	7	F	30	NORMAL	N/A	N/A
5	8	F	60	NORMAL	7	<5
5	9	F	20	N/A	N/A	N/A
6	10	M	N/A	NORMAL	N/A	N/A
7	11	F	39	D 1,8 E1,8	3,9	<5

F:feminino; M: masculino

Tabela 13. Análise germinativa das variantes alélicas do *ARMC5* dos 7 membros não relacionados, considerados aparentemente esporádicos e carreadores da mutação do *ARMC5*.

Caso Índex	Gênero	Idade	Diâmetro do nódulo (cm)	Cortisol após DST (ug/dL)	ACTH plasmático (pg/mL)
1	F	48	D 4,4 E 2,8	9,1	<5
2	F	50	D N/A E 10	5,6	<1
3	F	48	D 2,5 E 3	54,6	<2
4	F	N/A	D 1,2 E 0,7	5,2	<5
5	F	N/A	D 4 E 3,3	39,3	<2
6	F	N/A	D 1,9 E 2,4	7,5	<2
7	F	N/A	D 2,8 E 2,5	5,6	<5

F: feminino; M: masculino

5. Discussão

1. DISCUSSÃO

O *ARMC5* é um gene supressor tumoral envolvido na patogênese molecular da PMAH numa frequência de 35% – 55% dos pacientes. Mutações germinativas e somáticas têm sido descritas em pacientes com PMAH associados a nódulos suprarrenais bilaterais e secreção autônoma de cortisol. A apresentação clínica dos pacientes contempla um amplo espectro desde indivíduos normais, subclínicos até os que apresentam síndrome de Cushing manifesta. Esta variabilidade fenotípica tem sido reportada tanto intra e inter-familiar (11, 17, 22, 45-56).

No que se refere à imagem radiológica dos pacientes a variabilidade do tamanho dos nódulos suprarrenais bem como o comprometimento de ambas as suprarrenais foi bem documentado na maior genealogia da família Brasileira publicada previamente. O acometimento unilateral em 31% dos pacientes carreadores da mutação germinativa do *ARMC5* nos chamou a atenção uma vez que esses pacientes somente tiveram o diagnóstico de PMAH devido a um rastreamento genético ativo. Os pacientes com incidentalomas suprarrenais unilaterais, tão frequentes na prática clínica, com possível/autônoma secreção de cortisol poderiam estar associados à PMAH na sua forma assíncrona, como um grupo ainda subdiagnosticado. Neste projeto nos propusemos a realizar esta investigação numa coorte internacional multicêntrica prospectiva de pacientes com incidentalomas unilaterais associados à autonomia da secreção do cortisol.

Emms H e col. investigaram a frequência de variantes alélicas patogênicas germinativas do *ARMC5* em uma corte de 39 pacientes com nódulos suprarrenais incidentais bilaterais. Os autores não encontraram nenhuma variante alélica patogênica, até mesmo nos casos com hipercortisolismo subclínico, identificados pelo DST (51%

dos casos) (63). Outro estudo identificou em uma coorte de 98 casos com nódulos bilaterais esporádicos e familiares, que aproximadamente 25% deles eram carreadores de mutações germinativas do *ARMC5* (64). Entretanto, nesse estudo, não está claro se os pacientes apresentavam incidentalomas suprarrenais ou se foram investigados devido a síndrome de Cushing manifesta.

Nosso interesse também foi investigar numa coorte de 160 pacientes com incidentalomas bilaterais da suprarrenal associados à autonomia da secreção do cortisol, qual a frequência das variantes alélicas patogênicas do *ARMC5*. Identificamos em uma única paciente com diagnóstico de doença celíaca e incidentaloma bilateral suprarrenal, que realizou exame de imagem CT e identificou em 2011 nódulos adrenais bilaterais a variante alélica patogênica c.1084C>T p.Arg363Tr, no exon 3 no domínio de dimerização BTB da proteína *ARMC5*. A paciente apresentava o polimorfismo c.2114C>T, p.Ala705Val, rs 11150624. Durante a investigação ativa dos familiares para identificar a mutação específica, observamos que sua irmã e sua sobrinha também eram carreadoras da mesma variante patogênica. O teste de supressão de ambas (irmã e de sua sobrinha do caso índice) foi compatível com possível secreção autônoma do cortisol (cortisol de 3.5 ug/dL e 4,3 ug/dL respectivamente). Interessante desta família, a irmã do caso índice que estava em tratamento clínico de meningioma de acústico desde 2006 somente em 2015 teve o diagnóstico de PMAH-familiar. Intrigante é o fato dessa família num total de 10 do Serviço de Endocrinologia HCFMUSP, ser única em que as pacientes não desenvolveram síndrome de Cushing florida durante o seguimento (5 anos), apesar de terem idade (60 e 61 anos) acima dos casos com clínica de hipercortisolismo evidente.

Na coorte de pacientes com incidentaloma da suprarrenal unilateral não identificamos nenhuma variante alélica patogênica do *ARMC5*. Entretanto identificamos uma maior frequência de variantes polimórficas (~60%) comparadas à coorte do estudo de Emms H e cols. (8%) em incidentalomas bilaterais.

Em nossa coorte, a maioria dos pacientes, aproximadamente 60%, com incidentaloma suprarrenal (bilateral e unilateral), não apresentou supressão do cortisol após 1 mg de dexametasona *overnight*. Interessantemente, 26,5% destes pacientes o comprometimento suprarrenal era bilateral e foram classificados como secreção autônoma de cortisol enquanto apenas 10% dos pacientes com incidentalomas unilaterais apresentaram-se com secreção autônoma de cortisol. No entanto, todos apresentavam valores normais de ACTH plasmático e cortisol urinário de 24h.

Identificamos a variante alélica patogênica germinativa do *ARMC5* em uma única paciente com incidentaloma suprarrenal bilateral. A diferença de frequência dos outros trabalhos se dá por dois motivos; Emms H e cols. pesquisaram em poucos pacientes em poucos casos e a alta frequência no trabalho de pode ser por um bias de seleção da coorte, uma vez que não está claro quais pacientes todos eram incidentalomas bilaterais da suprarrenal.

Variantes alélicas germinativas patogênicas foram identificadas em todos os pacientes investigados com hipercortisolismo evidente e nódulos suprarrenais bilaterais.

O nosso questionamento inicial sobre a forma assíncrona da PMAH com nódulos unilaterais incidentais e autonomia da secreção do cortisol pudessem fazer parte do espectro da PMAH não foi confirmado nessa coorte multicêntrica. Somente na maior

genealogia Brasileira pudemos identificar essa variabilidade de apresentação radiológica (Tabela 3)

Em uma família brasileira previamente descrita, considerada a maior genealogia já estudada, 31% dos parentes do caso-índice, apresentavam nódulos suprarrenais unilaterais. Todos eram carreadores da mutação germinativa do *ARMC5* (p.Leu365Pro no exon 3) e apresentavam possível secreção do cortisol, após o DST (4). Até o momento, após um seguimento clínico de oito anos, esses pacientes não desenvolveram síndrome de Cushing bem como, não demonstraram envolvimento bilateral das suprarrenais na tomografia computadorizada de abdome de controle.

Novas perspectivas na compreensão dos mecanismos pelos quais mutações inativadoras do *ARMC5* possam levar a hipersecreção hormonal e hiperplasia celular tem sido propostas. Cavalcante e cols tem demonstrado que a interação entre *ARMC5* e *CUL3* leva à ubiquitinação de *ARMC5*, sugerindo que o *ARMC5* é um substrato para um complexo de ubiquitina. Estes dados mostram um novo mecanismo de regulação da proteína *ARMC5* e abrem novas perspectivas na compreensão da fisiopatologia da PMAH.

A PMAH é uma doença complexa, heterogênea em muitos aspectos, a padronização para estabelecer o diagnóstico, o melhor tratamento bem como o seguimento desses pacientes somente poderão ser estabelecidos com esforços colaborativos de centros de excelência nessa área.

6. Conclusão

1. CONCLUSÕES

- Este estudo nos permitiu conhecer a variabilidade e heterogeneidade da PMAH no que se refere a sua apresentação clínica-radiológica e molecular.
- Embora raros, a identificação de nódulos unilaterais que possam evoluir para nódulos bilaterais, caracterizando a forma assíncrona da doença, reforça a designação que temos proposto para esta complexa doença: *hiperplasia adrenocortical macronodular primária* (PMAH) uma vez que abrange todas as formas da sua apresentação.
- De acordo com os nossos resultados, a ausência de mutações germinativas no *ARMC5* em pacientes com incidentalomas suprarrenais unilaterais apontam para outros mecanismos que possam justificar um evento clínico tão comum.
- A presença da variante alélica patogênica em um único paciente com incidentaloma suprarrenal bilateral nos demonstra a raridade desta forma de apresentação clínica.
- A indicação da análise genética de rotina do gene *ARMC5* neste grupo de pacientes ainda não deve ser estabelecida.

7. Anexos

8.1 Artigos publicados durante a realização da tese

The Role of *gsp* Mutations on the Development of Adrenocortical Tumors and Adrenal Hyperplasia

Maria Candida Barisson Villares Fragoso*, Ingrid Quevedo Wanichi,
Isadora Pontes Cavalcante and Beatriz Marinho de Paula Mariani

Unidade de Suprarrenal, Disciplina de Endocrinologia e Metabolismo, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular
LIM/42, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

André Lacroix,

University of Montreal, Canada

Reviewed by:

Tullio Florio,

University of Genoa, Italy

Rafael Vazquez-Martinez,

University of Córdoba, Spain

*Correspondence:

Maria Candida Barisson

Villares Fragoso

maria.villares@hc.fm.usp.br

Specialty section:

This article was submitted to

Neuroendocrine Science,

published: 27 July 2016

Somatic *GNAS* point mutations, commonly known as *gsp* mutations, are involved in the pathogenesis of McCune–Albright syndrome (MAS) and have also been described in autonomous hormone-producing tumors, such as somatotropinoma, corticotrophoma, thyroid cancer, ovarian and testicular Leydig cell tumors, and primary macronodular adrenocortical hyperplasia (PMAH) (1–3). The involvement of *gsp* mutations in adrenal tumors was first described by Lyons et al. Since then, several studies have detected the presence of *gsp* mutations in adrenal tumors, but none of them could explain its presence along or the mechanism that leads to tumor formation and hormone hypersecretion. As a result, the molecular pathogenesis of the majority of sporadic adrenocortical tumors remains unclear (3). PMAH has also been reported with *gsp* somatic mutations in a few et al. identified two distinct *gsp* somatic mutations affecting arginine residues on codon 201 of *GNAS* in a few patients with PMAH who lacked any features or manifestations of MAS. Followed by this discovery, other studies have continued looking for *gsp* mutations based on strong prior evidence demonstrating that increased cAMP signaling is sufficient for cell proliferation and cortisol production (2, 4). With consideration for the previously reported findings, we conjecture that although somatic activating mutations in *GNAS* are a rare molecular event, these mutations could probably be sufficient to induce the development of macronodule hyperplasia and variable cortisol secretion. In this manuscript, we revised the presence of *gsp* mutations associated with adrenal cortical tumors and hyperplasia.

Targeted assessment of *G0S2* methylation identifies a rapidly recurrent, routinely fatal molecular subtype of adrenocortical carcinoma

Dipika R. Mohan^{1,2,15}, Antonio Marcondes Lerario^{3,4,15}, Tobias Else³, Bhramar Mukherjee^{5,6}, Madson Q. Almeida^{4,7}, Michelle Vinco⁸, Juilee Rege⁹, Beatriz M. P. Mariani⁴, Maria Claudia N. Zerbini¹⁰, Berenice B. Mendonca¹¹, Ana Claudia Latronico¹¹, Suely K. N. Marie¹², William E. Rainey⁹, Thomas J. Giordano^{3,8,13}, Maria Candida B. V. Fragoso^{4,7,16}, and Gary D. Hammer^{3,9,13,14,16}

University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA: ¹Medical Scientist Training Program; ²Doctoral Program in Cancer Biology; ³Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology, and Diabetes; ⁵Department of Biostatistics; ⁶Department of Epidemiology; ⁸Department of Pathology; ⁹Department of Molecular and Integrative Physiology; ¹³University of Michigan Rogel Cancer Center; ¹⁴Department of Cell & Developmental Biology

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil: ⁴Unidade de Suprarrenal, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia; ⁷Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - ICESP, Hospital das Clínicas; ¹⁰Departamento de Patologia; ¹¹Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia; ¹²Laboratório de Biologia Molecular e Celular/LIM15, Departamento de Neurologia

¹⁵Co-first author, ¹⁶Co-senior author

Running title: *G0S2* methylation predicts rapid recurrence and death in ACC

8.2 Apresentação de trabalho oral – COPEM 2017

Papel do *ARMC5* em culturas de células de Hiperplasia Macronodular Adrenocortical Primária (PMAH)

Cavalcante, IP¹, Nishi M², Zerbini MCN³, **Mariani BMP²**, Chambo JL⁴, Almeida MQ^{2,5},
Lotfi CFP^{1*}, Fragoso MCBV^{2,5*}

¹Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia da USP

²Laboratório de Investigação Médica LIM/42 HCFMUSP

³Departamento de Patologia ⁴Departamento de Urologia HCFMUSP

⁵Unidade de Suprarrenal, Disciplina de Endocrinologia & Metabolologia da FMUSP

**Os autores contribuíram igualmente para a realização deste trabalho.*

8. Referências

9. REFERÊNCIAS

1. Fasnacht M; Arlt W; Bancos I; Dralle H; Newell-Price J; Sahdev A; Tabarin A; Terzolo M; Tsagaraki S; Dekkers O. M; Management of suprarrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Suprarrenal Tumors. Clinical Practice Guideline. 2016; 175:2; G1-G34.
2. Terzolo M, Stigliano A, Chiodini I, Loli P, Furlani L, Arnaldi G, et al. AME position statement on suprarrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(6):851-70.
3. Bourdeau I1, El Ghorayeb N1, Gagnon N1, Lacroix A1.; management of endocrine disease: Differential diagnosis, investigation and therapy of bilateral suprarrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol*. 2018 Aug;179(2):R57-R67. doi: 10.1530/EJE-18-0296. Epub 2018 May 10.
4. Nawar R, Aron D. Suprarrenal incidentalomas: a continuing management dilemma. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12:585–598.
5. Singh PK, Buch HN. Suprarrenal incidentaloma: evaluation and management. *J Clin Pathol* 2008; 61:1168–1173.
6. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2006;367:1605-17.
7. Lacroix A, Bourdeau I. Bilateral suprarrenal Cushing's syndrome: macronodular suprarrenal hyperplasia and primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2005;34:441-58.
8. Kirschner MA, Powell RD, Jr., Lipsett MB. Cushing's Syndrome: Nodular Cortical Hyperplasia of Suprarrenal Glands with Clinical and Pathological Features Suggesting Adrenocortical Tumor. *J Clin Endocrinol Metab*. 1964;24:947-55.
9. Lacroix A. ACTH-independent macronodular suprarrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23:245-59.
10. Findlay JC, Sheeler LR, Engeland WC, Aron DC. Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular suprarrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76:189-91.
11. Oheda T, Noguchi Y, Morio H, Terano T, Hirai A, Tamura T. Study on steroidogenic activity of ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia which occurred in brothers in a cancer family. *Folia Endocrinologica*. 1995;71:416-19.

12. Minami S, Sugihara H, Sato J, Tatsukuchi A, Sugisaki Y, Sasano H, Wakabayashi I. ACTH independent Cushing's syndrome occurring in siblings. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996;44:483-8.
13. Someya T, Koyano H, Osawa Y. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH) in two brothers and a sister. *Folia Endocrinologica*. 1996;72:762-66.
14. Imohl M, Koditz R, Stachon A, Muller KM, Nicolas V, Pfeilschifter J, Krieg M. [Catecholamine-dependent hereditary Cushing's syndrome - follow-up after unilateral suprarrenalectomy]. *Med Klin (Munich)*. 2002;97:747-53.
15. Miyamura N, Taguchi T, Murata Y, Taketa K, Iwashita S, Matsumoto K, Nishikawa T, Toyonaga T, Sakakida M, Araki E. Inherited adrenocorticotropin-independent macronodular suprarrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines: detection of the aberrant hormone receptors on suprarrenal gland. *Endocrine*. 2002;19:319-26.
16. Nies C, Bartsch DK, Ehlenz K, Wild A, Langer P, Fleischhacker S, Rothmund M. Familial ACTH-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular suprarrenal hyperplasia clinically affecting only female family members. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002;110:277-83.
17. Lee S, Hwang R, Lee J, Rhee Y, Kim DJ, Chung UI, Lim SK. Ectopic expression of vasopressin V1b and V2 receptors in the suprarrenal glands of familial ACTH-independent macronodular suprarrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63:625-30.
18. Watson TD, Patel SJ, Nardi PM. Case 121: familial adrenocorticotropin-independent macronodular suprarrenal hyperplasia causing Cushing syndrome. *Radiology*. 2007;244:923-6.
19. Vezzosi D, Cartier D, Regnier C, Otal P, Bennet A, Parmentier F, Plantavid M, Lacroix A, Lefebvre H, Caron P. Familial adrenocorticotropin-independent macronodular suprarrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin suprarrenal receptors. *Eur J Endocrinol*. 2007;156:21-31.
20. Gagliardi L, Hotu C, Casey G, Braund WJ, Ling KH, Dodd T, Manavis J, Devitt PG, Cutfield R, Rudzki Z, Scott HS, Torpy DJ. Familial vasopressin-sensitive ACTH-independent macronodular suprarrenal hyperplasia (VPs-AIMAH): clinical studies of three kindreds. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70:883-91.
21. Bourdeau I, Boisselle A, Rioux D, Neculau M, Hamet P, A. L. Systematic clinical screening of members of a family with hereditary cortisol-secreting B-adrenergic responsive ACTH-Independent Macronodular Suprarrenal Hyperplasia (AIMAH) reveals unsuspected subclinical Cushing's syndrome (CS) and aberrant B-adrenergic regulation of cortisol secretion. In: Program of the 89th Annual Meeting of the Endocrine Society. June 2-5, 2007. Toronto, Canada. Abstract OR54-2; 2007. p.148.

22. Alencar GA, Lerario AM, Nishi MY, Mariani BMP, Almeida MQ, Tremblay J, et al. ARMC5 Mutations are a Frequent Cause of Primary Macronodular Suprarrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;jc20134237.
23. Antonini SR, Fragoso MC, Lacroix A. [Clinical and molecular aspects of the ACTH-independent bilateral macronodular suprarrenal hyperplasia]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(5):620-36.
24. Schteingart DE. The clinical spectrum of adrenocortical hyperplasia. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012;19:176-82.
25. Ohashi A, Yamada Y, Sakaguchi K, Inoue T, Kubo M, Fushimi H. A natural history of adrenocorticotropin-independent bilateral suprarrenal macronodular hyperplasia (AIMAH) from preclinical to clinically overt Cushing's syndrome. *Endocr J*. 2001;48:677-83.
26. Swain JM, Grant CS, Schlinkert RT, Thompson GB, vanHeerden JA, Lloyd RV, Young WF. Corticotropin-independent macronodular suprarrenal hyperplasia: a clinicopathologic correlation. *Arch Surg*. 1998;133:541-5.
27. Lee S, Hwang R, Lee J, Rhee Y, Kim DJ, Chung UI, et al. Ectopic expression of vasopressin V1b and V2 receptors in the suprarrenal glands of familial ACTH-independent macronodular suprarrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63(6):625-30.
28. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol*. 2006;5:1045-54.
29. Rockall AG, Babar SA, Sohaib SA, Isidori AM, Diaz-Cano S, Monson JP, Grossman AB, Reznek RH. CT and MR imaging of the suprarrenal glands in ACTH-independent cushing syndrome. *Radiographics*. 2004;24:435-52.
30. Rockall AG, Babar SA, Sohaib SA, Isidori AM, Diaz-Cano S, Monson JP, Grossman AB, Reznek RH. CT and MR imaging of the suprarrenal glands in ACTH-independent cushing syndrome. *Radiographics*. 2004;24:435-52.
31. Doppman JL, Chrousos GP, Papanicolaou DA, Stratakis CA, Alexander HR, Nieman LK. Adrenocorticotropin-independent macronodular suprarrenal hyperplasia: an uncommon cause of primary suprarrenal hypercortisolism. *Radiology*. 2000;216:797-802.
32. Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E. 18F-FDG PET/CT in the evaluation of suprarrenal masses. *J Nucl Med*. 2006;47:32-7.
33. Boland GW, Blake MA, Holalkere NS, Hahn PF. PET/CT for the characterization of suprarrenal masses in patients with cancer: qualitative versus quantitative accuracy in 150 consecutive patients. *AJR Am J Roentgenol*. 2009;192:956-62.
34. Blake MA, Cronin CG, Boland GW. Suprarrenal imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;194:1450-60.

35. Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E. 18F-FDG PET/CT in the evaluation of suprarrenal masses. *J Nucl Med.* 2006;47:32-7.
36. Boland GW, Blake MA, Holalkere NS, Hahn PF. PET/CT for the characterization of suprarrenal masses in patients with cancer: qualitative versus quantitative accuracy in 150 consecutive patients. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;192:956-62.
37. Tessonnier L, Sebag F, Palazzo FF, Colavolpe C, De Micco C, Mancini J, Conte-Devolx B, Henry JF, Mundler O, Taieb D. Does 18F-FDG PET/CT add diagnostic accuracy in incidentally identified non-secreting suprarrenal tumours? *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008;35:2018-25.
38. Bourdeau I, Stratakis CA. Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular suprarrenal disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;968:240-55.
39. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in suprarrenal Cushing's syndrome. *Endocrine reviews.* 2001;22(1):75-110.
40. Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, et al. Intrasuprarrenal corticotropin in bilateral macronodular suprarrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 2013;369(22):2115-25.
41. Assié G, Libé R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscip W, et al. ARMC5 mutations in macronodular suprarrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 2013;369(22):2105-14.
42. Assie G, Libe R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscip W, et al. ARMC5 Mutations in Macronodular Suprarrenal Hyperplasia with Cushing's Syndrome. *The New England journal of medicine.* 2013;369(22):2105-14.
43. Gagliardi L, Schreiber AW, Hahn CN, Feng J, Cranston T, Boon H, et al. ARMC5 Mutations Are Common in Familial Bilateral Macronodular Suprarrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(9):E1784-92.
44. Correa R, Zilbermint M, Berthon A, Espiard S, Batsis M, Papadakis GZ, Xekouki P, Lodish MB, Bertherat J, Faucz FR, Stratakis CA. The ARMC5 gene shows extensive genetic variance in primary macronodular adrenocortical hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2015 Oct;173(4):435-40. doi: 10.1530/EJE-15-0205. Epub 2015 Jul 10. PMID: 26162405
45. Findlay JC, Sheeler LR, Engeland WC, Aron DC. Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular suprarrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76(1):189-91.
46. Minami S, Sugihara H, Sato J, Tatsukuchi A, Sugisaki Y, Sasano H, Wakabayashi I. ACTH independent Cushing's syndrome occurring in siblings. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;44:483-8.
47. Someya T, Koyano H, Osawa Y. ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH) in two brothers and a sister. *Folia Endocrinologica.* 1996;72:762-66.

48. Imohl M, Koditz R, Stachon A, Muller KM, Nicolas V, Pfeilschifter J, Krieg M. [Catecholamine-dependent hereditary Cushing's syndrome - follow-up after unilateral suprarrenalectomy]. *Med Klin (Munich)*. 2002;97:747-53.
49. Miyamura N, Taguchi T, Murata Y, Taketa K, Iwashita S, Matsumoto K, Nishikawa T, Toyonaga T, Sakakida M, Araki E. Inherited adrenocorticotropin-independent macronodular suprarrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines: detection of the aberrant hormone receptors on suprarrenal gland. *Endocrine*. 2002;19:319-26.
50. Nies C, Bartsch DK, Ehlenz K, Wild A, Langer P, Fleischhacker S, Rothmund M. Familial ACTH-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular suprarrenal hyperplasia clinically affecting only female family members. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002;110:277-83.
51. Watson TD, Patel SJ, Nardi PM. Case 121: familial adrenocorticotropin-independent macronodular suprarrenal hyperplasia causing Cushing syndrome. *Radiology*. 2007;244:923-6.
52. Vezzosi D, Cartier D, Regnier C, Otal P, Bennet A, Parmentier F, Plantavid M, Lacroix A, Lefebvre H, Caron P. Familial adrenocorticotropin-independent macronodular suprarrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin suprarrenal receptors. *Eur J Endocrinol*. 2007;156:21-31.
53. Bourdeau I, Boisselle A, Rioux D, Neculau M, Hamet P, A. L. Systematic clinical screening of members of a family with hereditary cortisol-secreting B-adrenergic responsive ACTH-Independent Macronodular Suprarrenal Hyperplasia (AIMAH) reveals unsuspected subclinical Cushing's syndrome (CS) and aberrant B-adrenergic regulation of cortisol secretion. In: Program of the 89th Annual Meeting of the Endocrine Society. June 2-5, 2007. Toronto, Canada. Abstract OR54-2; 2007. p.148.
54. Gagliardi L, Hotu C, Casey G, Braund WJ, Ling KH, Dodd T, et al. Familial vasopressin-sensitive ACTH-independent macronodular suprarrenal hyperplasia (VPs-PMAH): clinical studies of three kindreds. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(6):883-91.
55. Elbelt U, Trovato A, Kloth M, Gentz E, Finke R, Spranger J, et al. Molecular and Clinical Evidence for an ARMC5 Tumor Syndrome: Concurrent Inactivating Germline and Somatic Mutations are Associated with both Primary Macronodular Suprarrenal Hyperplasia and Meningioma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;jc20142648.
56. Suzuki S, Tatsuno I, Oohara E, Nakayama A, Komai E, Shiga A, Kono T, Takiguchi T, Higuchi S, Sakuma I, Nagano H, Hashimoto N, Mayama T, Koide H, Sasano H, Nakatani Y, Imamoto T, Ichikawa T, Yokote K, Tanaka T. Germline Deletion of *Armc5* in Familial Primary Macronodular Suprarrenal Hyperplasia. *Endocr Pract*. 2015 Oct;21(10):1152-60. doi: 10.4158/EP15756.OR. Epub 2015 Jul 27.

57. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, Szarek E, Trivellin G, Sinaii N, et al. Macronodular Suprarrenal Hyperplasia due to Mutations in an Armadillo Repeat Containing 5 (ARMC5) Gene: A Clinical and Genetic Investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;jc20134280.
58. Cavalcante IP, Nishi M, Zerbini MCN, Almeida MQ, Brondani VB, Botelho MLAA, Tanno FY, Srougi V, Chambo JL, Mendonca BB, Bertherat J, Lotfi CFP, Fragoso MCBV. The role of ARMC5 in human cell cultures from nodules of primary macronodular adrenocortical hyperplasia (PMAH). *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Jan 15;460:36-46. doi: 10.1016/j.mce.2017.06.027. Epub 2017 Jul 1. PMID:28676429
59. Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Pereira MA, Zerbini MC, et al. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(5):2147-51.
60. Coates JC. Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends Cell Biol.* 2003;13(9):463-71.
61. Tewari R, Bailes E, Bunting KA, Coates JC. Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* 2010;20(8):470-81.
62. Xu W, Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 19):3337-44.
63. Emms H, Tsiros I, Cranston T, Tsagarakis S, Grossman AB. Do patients with incidentally discovered bilateral suprarrenal nodules represent an early form of ARMC5-mediated bilateral macronodular hyperplasia?. *Endocrine.* 2016 Sep;53(3):801-8. doi: 10.1007/s12020-016-0988-4. Epub 2016 Jun 15.
64. Espiard S, Drougat L, Libé R, Assié G, Perlemoine K, Guignat L, Barrande G, Brucker-Davis F, Doullay F, Lopez S, Sonnet E, Torremocha F, Pinsard D, Chabbert-Buffet N, Raffin-Sanson ML, Groussin L, Borson-Chazot F, Coste J, Bertagna X, Stratakis CA, Beuschlein F, Ragazzon B, Bertherat J. ARMC5 Mutations in a Large Cohort of Primary Macronodular Suprarrenal Hyperplasia: Clinical and Functional Consequences. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jun;100(6):E926-35. doi: 10.1210/jc.2014-4204. Epub 2015 Apr 8.